الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/**2021**

THÈSE

Présentée par

HAICHOUR Nora

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : BIOLOGIE

Spécialité : MICROBIOLOGIE

THÈME

ÉTUDE DES EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RÉSINE DE PIN

Soutenue le 25/11/2021

DEVANT LE JURY

Président	KHENCHOUCHE Abdelhalim	**MCA. UFA Sétif 1**
Directeur	ZERROUG Mohamed Mihoub	**Pr. Univ. Batna 2**
Co-directeur	MEZAACHE-AICHOUR Samia	**Pr. UFA Sétif 1**
Examinateurs	BOUDJELAL Amel	**Pr. Univ. M'sila**
	NABTI Elhafid	**Pr. Univ. Bejaia**

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

Remerciements

Tout d'abord, je remercie mon DIEU ALLAH le tout puissant, auteur de ma vie, qui m'a donné la santé et le courage pour achever ce travail.

Je ne saurais trouver les mots convenables pour remercier Mr Zerroug Mohamed Mihoub (Professeur à l'université Batna 2) et Mme Mezaache Samia (Professeur à l'université Sétif1) car sans leurs efforts et suivi permanents je n'aurais jamais entamé un tel travail. Qu'ils trouvent l'expression de ma profonde gratitude et QUE leurs VIES soient couronnées de succès que de succès.

Mes remerciements iront particulièrement à Mr Khenchouche Abdelhalim, Maitre de conférence classe « A » à l'université Ferhat Abbas Sétif 1, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance et pour les aides précieuses qu'il m'a apportées

Je tiens également à remercier Mme Boudjelal Amel (Professeur au sein de l'université de M'Sila) de m'avoir honorée en acceptant de juger ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de mes profonds et respectueux sentiments

Pour une seconde rencontre, je serais très ravie de revoir Mr Nabti Elhafid, Professeur à l'université Abderrahmane Mira « Béjaia » comme examinateur de ce modeste travail ; qu'il trouve l'expression de ma profonde gratitude

Je suis certaine que le débat en présence de ces membres de jury ne sera que fructueux

Mes remerciements sont adressés à M^elle Ounas Feriel, Doctorante au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'université Ferhat Abbas Sétif 1 pour ses précieuses interventions aux moments les plus critiques

Je ne pourrais citer les noms de tous ceux m'ayant aidée de près ou de loin, car trop nombreux mais ils occupent une place privilégiée dans mon cœur

Sommaire

ملخص i

Résumé ii

Abstract iii

Liste des abréviations iv

Liste des figures v

Liste des tableaux vi

Introduction 1

Chapitre 1er La résine de *Pinus halepensis* Mill. 4

1.1. Répartition du pin d'Alep dans le bassin méditerranéen 4

1.2. Importance historique et culturelle des résines 5

1.3. Utilisations et modes de préparation de la résine de pin 5

1.4. Propriétés écologiques des résines 7

2nd Chapitre Quorum Sensing 9

2.1. Définition du Quorum Sensing (QS) 9

2.2. Communication cellulaire *versus* Développement du QS 9

2.3. Classes d'autoinducteurs 11

2.3.1. Les autoinducteurs 1 12

2.3.2. Les autoinducteurs 2 12

2.3.3. Les autoinducteurs peptidiques 13

2.4. Régulation du QS 14

2.4.1. Régulation du QS chez les bactéries à Gram négatif 16

2.4.1.a. Régulation QS chez *P. aeruginosa* 16

Les systèmes LasI – LasR / RhlI – RhlR de *P. aeruginosa 18

***Système PQS** 20

***Le système QscR** 21

***Système QS intégré** 21

2.4.2. Régulation QS chez les Gram positifs 22

2.4.2.b. Régulation QS chez *Staphylococcus aureus* 22

2.5. Quorum Quenching 25

Partie pratique .....

Composition chimique de l'extrait aqueux de la résine de *Pinus halepensis* Mill. .....

1. Introduction 26

2. Matériel et méthodes 28
2.1. Matériel végétal 28
2.2. Préparation de l'extrait aqueux lyophilisé de résine de pin (EALRP) 28
2.3. Composition chimique de EALRP par GC/MS 28
3. Résultats et discussion 30
Activité antioxydante de l'EALRP 29
1. Introduction 34
2. Matériels et méthodes 36
2.1. Matériel 36
2.2. Méthodes 36
2. 2.1. Méthode au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) 36
2.2.2. Méthode au β-carotène 37
2.3. Analyse statistique 37
3. Résultats et discussion 38
3.1. Effet piégeur des radicaux DPPH par l'EALRP 38
3.2. Test de blanchiment au β-carotène 41
Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux lyophilisé de résine de *Pinus halepensis* Mill. 33
Mode d'action antibactérienne 43
1. Introduction 43
2. Matériel et méthodes 46
2.1. Matériel 46
2.2. Inhibition du Quorum Sensing par EALRP 46
2.2.1. Défi *Artemia* (*Artemia* challenge) 46
2.2.2. Dépistage de l'activité anti QS de EALRP 47
2.2.3. Dégradation de l'HHL 48
2.3. Activité anti biofilm 48
2.4. Analyse statistique 49
3. Résultats et discussion 50
3.1. Protection d'*Artemia* par l'EALRP 51
3.2. Activité anti-QS de l'EALRP 52
3.3. Dégradation de l'AHL 54
3.4. Activité anti biofilm 56
Activité antifongique d'EALRP 59

1. Introduction 59
2. Matériel et méthodes 61
2.1. Souches fongiques 61
2.2. Activité antifongique 61
2.3. Analyse statistique 62
3. Résultats et discussion 63
Discussion générale 66
Conclusion et Perspectives 78
Références bibliographiques 81
Annexe : Rapport de la composition chimique de l'EALRP par GC/MS I

ملخص

قد يكون استخدام النباتات للتخفيف من معاناة الإنسان قديمًا قدم البشر، يستخدم صمغ *Pinus halepensis* في الطب الجزائري التقليدي كمضاد للميكروبات، مضاد للالتهابات، مسكن وعامل شفاء ، لعلاج أمراض الجهاز التنفسي والبولي ، إلخ. في هذه الدراسة، تم إخضاع المستخلص المائي المجفف بالتجميد (EALRP) من الراتنج من *Pinus halepensis* Mill. لتحليل تركيبه الكيميائي بواسطة كروماتوجرافيا الغاز إلى جانب قياس الطيف الكتلي .(GC / MS) يتم تقييم نشاط مضادات الأكسدة في المختبر باستخدام 2،2-ثنائي فينيل-ب، بيكريل هيدرازيل (DPPH) وتبييض بيتا كاروتين. ثم تم بحث القدرات المضادة للميكروبات. تقييم مضاد للجراثيم من خلال تسليط الضوء على قوة الاستشعار عن بعد من هذا المستخلص. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء تقييم للنشاط المضاد للفطريات، وبشكل أكثر تحديدًا ضد الفطريات الجلدية. أظهرت النتائج أن EALRP يحتوي على 64.57٪ من المركبات العطرية وحمض السكسينيك والسكريات والسكريات الكحولية والقلويدات ومركبات أخرى تمثل على التوالي 0.58٪ و6.45٪ و0 و87٪ و2.05٪. أظهرت نتائج مسح الجذور الحرة أن EALRP تمتلك قدرة كبيرة نسبيًا على إزالة الجذور الحرة باستخدام اختبارDPPH ، وكان التثبيط أكبر من 90 ٪ فقط عند 150 و200 ميكروغرام / مل على التوالي لـ BHT و EALRP .كما تم إثبات نشاط مضاد للأكسدة جيد باستخدام اختبار بيتا كاروتين؛ حدث الانخفاض في OD بين 0 و15 دقيقة ثم أصبح أبطأ بالنسبة للراتنج وBHT، وهو ما يفسر تثبيطًا ملحوظًا وهامًا لأكسدة-β كاروتين. بالإضافة إلى قدراته المضادة لـ QS من خلال تدهور وتثبيط إشارات الاتصالات، قام EALRPبشكل كبير بتثبيط تكوين Biofilm في البكتيريا المسؤولة عن عدوى المستشفيات وحماية *Artemia*ضد .*Vibrio harveyi* BB120 كان نشاطه المضاد للفطريات مهمًا أيضًا حيث زادت نسب المثبطات مع وقت الحضانة والتركيز المستخدم.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للأكسدة، مضاد QS، مضاد للميكروبات ، GC / MS، *Pinus halepensis*، الراتنج.

Résumé

L'utilisation de plantes pour atténuer la souffrance humaine est peut-être aussi vieille que l'homme. En médecine traditionnelle algérienne, la résine de *Pinus halepensis* est utilisée comme antimicrobien, anti-inflammatoire, analgésique, cicatrisant, pour le traitement des maladies respiratoires et urinaires, ...etc. Dans la présente étude, l'extrait aqueux lyophilisé (EALRP) de résine de *Pinus halepensis* Mill. a été soumis à une analyse pour déterminer sa composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). L'activité antioxydante est évaluée *in vitro* à l'aide du 2,2-diphényle-b, picrylhydrazyle (DPPH) et le blanchiment du β-carotène. Ensuite les capacités antimicrobiennes ont été recherchées. Une évaluation antibactérienne par la mise en évidence du pouvoir antiquorum sensing de cet extrait. En plus d'une évaluation de l'activité antifongique a été menée, plus précisément anti dermatophyte. Les résultats ont montré que l'EALRP contenait 64,57 % de composés aromatiques, l'acide succinique, des sucres et des sucres alcooliques, des alcaloïdes et d'autres composés qui représentent respectivement 0,58%, 6,45%, 0,87% et 2,05%. Les résultats de piégeage des radicaux libres ont montré que l'EALRP possédait une capacité assez significative de piégeage des radicaux libres en utilisant le test DPPH, l'inhibition était supérieure à 90% à seulement 150 et 200 µg / ml respectivement pour le BHT et l'EALRP. Une bonne activité antioxydante en utilisant le test du β-carotène a aussi été démontrée. Outre ses capacités anti QS par la dégradation et l'inhibition des signaux de communications, l'EALRP a significativement inhibé la formation de Biofilm chez des bactéries responsables d'infections nosocomiales et a protégé *Artémia* contre *Vibrio harveyi* BB120. Son activité antifongique a aussi été importante où les pourcentages d'inhibitions augmentaient avec le temps d'incubation et la concentration utilisée.

Mots clés : activité antioxydante, anti QS, activité anti microbienne, GC/MS, *Pinus halepensis*, résine.

Summary

The use of plants to alleviate human suffering may be as old as humans. In traditional Algerian medicine, *Pinus halepensis* resin is used as an antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, healing agent, for the treatment of respiratory and urinary diseases, etc. In the present study, the *Pinus halepensis* Mill. resin lyophilized aqueous extract (EALRP) was analyzed for its chemical composition by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). The antioxidant activity is evaluated *in vitro* using 2,2-diphenyl-b, picrylhydrazyle (DPPH) and the bleaching of β-carotene. Then the antimicrobial was tested and focused on the antiquorum sensing power and antidermatophytic activity. The results showed that the EALRP contained 64.57% aromatic compounds. Succinic acid, sugars, alcoholic sugars, alkaloids and other compounds respectively represent 0.58%, 6.45%, 0.87% and 2.05%. The free radical scavenging results showed that the EALRP possessed a fairly significant free radical scavenging capacity using the DPPH test, the inhibition was greater than 90% at only 150 and 200 µg / ml respectively for BHT and EALRP. Good antioxidant activity using the β-carotene test has also been demonstrated. In addition to its anti-QS capabilities through degradation and inhibition of communications signals, EALRP significantly inhibited Biofilm formation in bacteria responsible for nosocomial infections and protected *Artemia* against *Vibrio harveyi* BB120. Its antifungal activity was also important where the percentages of inhibitions increased with the incubation time and the concentration used.

Keywords: Antioxidant activity, anti QS, anti-microbial, GC/MS, *Pinus halepensis*, resin.

Liste des abréviations

ACP	Protéine porteuse d'acyle ou acyl carrier protein
AHL	Acyl-homosérine lactone
AI	Autoinducteur
AIP	Autoinducteur peptidique
BHL	C4-HSL ou N-butyryl homosérine lactone
BHT	Hydroxytoluène butylé
CAS	Chemical Abstracts Service
CV026	*Chromobacterium violaceum* 026
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DPD	4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EALRP	Extrait Aqueux Lyophilisé de Résine de Pin
HE	Huile essentielle
HHL	N-héxanoyl homosérine lactone
HHQ	2-heptyl-4-quinolone
HK	Histidine kinase
HSL	Homosérine lactone
IQS	QS intégré
Milieu LB	Milieu Luria - Bertani
NIST	National Institute of Standards and Technology
OdDHL	3-oxo-C12-HSL ou 3-oxo-C12-homosérine lactone
PQS	*Pseudomonas* Quinolone Signal
PSM	Modulines de type surfactant solubles dans le phénol
QQ	Quorum Quenching
QS	Quorum Sensing
QSI	Inhibiteurs du quorum sensing
QSS	Systèmes QS
ROS	Reactive oxygen species ou espèces réactives d’oxygène
SAM	S-adénosyl-méthionine
VIH	Virus de l’immunodéficience humaine

Liste des figures

Figure 1. Répartition de *Pinus halepensis* et *Pinus brutia* sur le pourtour méditerranéen 4

Figure 2. Chronologie des événements importants dans l'histoire de l'utilisation humaine de la résine 6

Figure 3. Régulation des gènes dépendante de la densité de population 10

Figure 4. Représentation schématique des quatre réseaux de signalisation QS chez *P. aeruginosa* et de leurs régulons respectifs 17

Figure 5. Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa* 19

Figure 6. Voie générale de la régulation du quorum sensing pilotée par Agr chez les staphylocoques 24

Figure 7. Taux des constituants majeurs de l'EALRP obtenus par GC/MS 33

Figure 8. Taux de l'effet scavenger du DPPH par l'EALRP et le BHT 39

Figure 9. Activité antioxydante de l'EALRP par le test de blanchiment du β-carotène 41

Figure 10. Test de cytotoxicité et de protection d'*Artemia* par EALRP 52

Figure 11. Activité anti QS de l'EALRP 54

Figure 12. Dégradation de l'AHL en présence d'EALRP 55

Figure 13. Dégradation de l'HHL en présence de EALRP 56

Figure 14. Pourcentages d'inhibition de formation de biofilm par *P. aeruginosa* et *S. aureus* en présence de l'EALRP 57

Figure 15. Pourcentages d'inhibition de croissance de champignons dermatophytes testés par l'EALRP 64

Liste des tableaux

Tableau I. Utilisations ethnomédicinales de *Pinus halepensis* en Algérie..... 8

Tableau II. Différents facteurs de virulence utilisés au cours de l'infection 15

Tableau III. Composition chimique de l'EALRP par GC/MS 31

Introduction générale

L'utilisation de plantes pour atténuer la souffrance humaine est peut-être aussi vieille que l'homme. Presque toutes les civilisations, depuis l'Antiquité, ont utilisé les plantes comme source de médicaments (Mukherjee, 2009). Les propriétés médicinales de différentes espèces végétales ont contribué à l'origine et à l'évolution de nombreuses thérapies traditionnelles (Malik *et al*., 2012) et la découverte de médicaments (Lopez, 2011). Dans de nombreux pays en développement, la médecine traditionnelle reste le pilier des soins de santé et même dans les pays développés les plantes médicinales sont utilisées, en particulier contre les affections mineures. En outre, la médecine moderne dépend des plantes pour différents médicaments essentiels (Mukherjee, 2009). L'influence des produits naturels dans la découverte de médicaments est devenue très importante depuis les années 1980. Entre 1981 et 2006, plus de 50% des médicaments approuvés sont à base de structures de produits naturels : 5.7% de produits naturels, 27.6% dérivés d'un produit naturel souvent par semi-synthèse, 17.1% fabriqués par synthèse totale mais le pharmacophore provenait d'un produit naturel (Newman et Cragg, 2007). Pour ces raisons, l'ethnobotanique et la médecine traditionnelle peuvent toujours être une stratégie utile et un outil précieux pour la recherche pharmaceutique future (Lopez, 2011).

Les plantes médicinales proviennent presque de toutes les régions du globe. Leurs utilisations industrielles sont nombreuses. Celles-ci vont des médicaments traditionnels comme les tisanes, en passant par les aliments naturels tels les produits nutraceutiques aux produits pharmaceutiques, phytopharmaceutiques et pharmaceutiques fabriqués industriellement (Mukherjee, 2009). En effet, même les plantes dites «mauvaises herbes» sont utilisées comme source de produits pharmaceutiques, elles contiennent beaucoup de composés médicinaux bioactifs (Stepp, 2004).

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

Depuis des siècles, les populations algériennes utilisent les plantes médicinales et aromatiques sous différentes formes pour traiter plusieurs maux (Reguieg, 2011) ; la décoction (48%), la matière première (30%), l'infusion (13%) et les pâtes à base de plantes (5%) sont les modes de préparation les plus fréquemment utilisés. Les plantes sont souvent mélangées à d'autres adjuvants tels que le miel, le lait, l'huile d'olive, l'eau de rose, le sucre ou les œufs. L'ajout de ces ingrédients tels que le miel ou le sucre vise à améliorer l'acceptabilité de certaines plantes au goût amer insupportable. Le miel et le lait sont les plus utilisés comme adjuvants (Benarba *et al*., 2015).

Les plantes médicinales utilisées en Algérie, comprennent un groupe avec très peu d'espèces sauvages très peu exigeantes et poussant dans des sols et des régions climatiques très variés allant de la zone subhumide non loin de la côte méditerranéenne (moutarde, camomille, lavande, ...) aux zones arides et semi-arides du sud avec un climat chaud et sec (l'armoise,…). Un autre groupe comprend des espèces nécessitant principalement de l'eau et des engrais et qui se développent dans de petites et moyennes zones comme la menthe, la verveine, le citron, le romarin,... (Reguieg, 2011).

Parmi les plantes médicinales, les pins revêtent une grande importance en raison de leurs bienfaits. Citons *Pinus sylvestris* L. qui est un arbre forestier économiquement important reconnu comme source de composés bioactifs aux propriétés médicinales (Alfredsen *et al*., 2008). *Pinus pinea* est cultivé pour ses pignons comestibles, comme arbre d'ornement et couramment planté dans les jardins et les parcs. Son huile essentielle est utilisée pour diverses affections cutanées, plaies, brûlures, dans les bains de vapeur aux herbes et divers inhalateurs (Demirci *et al*., 2015). Les constituants de l'écorce de pin sont d'importants antioxydants ; ils n'arrêtent pas le vieillissement, processus biologique génétiquement programmé, mais peuvent empêcher, atténuer ou inhiber les différents effets nocifs du vieillissement causés par un excès de radicaux libres (Masquelier, 1997). Les sesquiterpènes de *Pinus longifolia* et les éthers d'oximes de composés carbonylés dérivés du longifolène ont une importante activité anti-moustique (Mir *et al*., 2018).

Le pin a des utilisations nombreuses et variées en Algérie selon les régions et les maladies. Le pin présente des avantages pour les systèmes gastro-intestinal (Benarba *et al*., 2015), respiratoire, urinaire et stimule les glandes surrénales. Il est utilisé comme antiseptique et recommandé contre les bronchites, les pneumonies et les rhumes (Rebbas *et al*., 2012); le pin a également des propriétés antifongiques (Chermat et Gharzouli, 2015).

Traditionnellement, l'écorce de pin était utilisée pour traiter principalement les brûlures, les plaies et les inflammations de la peau. Différentes parties de pin sont utilisées en décoction. La poudre de résine de pin mélangée au miel ou à l'huile d'olive est utilisée dans les cas de grippe et de toux. La résine de pin était utilisée même pour traiter l'asthme (Meddour et Meddour-Sahar, 2015) et en tant que cataplasme contre les rhumatismes (Rebbas *et al*., 2012).

De plus, les résines naturelles ont un très vaste spectre d'applications. Elles sont utilisées essentiellement par les industries de revêtements (vernis, laques, peintures, mastics, ciments, colles...), de l'impression (encres d'imprimerie...), de la papeterie (encollage du papier) et des polymères (adhésifs, caoutchouc, matériaux divers). Les gommes et de nombreuses résines sont par ailleurs la source d'une gamme de produits très variés pour les industries de l'agroalimentaire, la parfumerie, la cosmétologie, la pharmacie et la médecine (Delmond**,** 2002 ; Mercier *et al*., 2009 ; Tümen et Reunanen, 2010).

Bien que l'utilisation d'extraits aqueux soit une pratique courante dans la médecine traditionnelle et les processus alimentaires, la composition et la fonction des extraits aqueux de pin ont été rarement rapportées de par le monde (Feng *et al*., 2010).

Les propriétés thérapeutiques intéressantes des pins nous ont amenés à tester des effets de la résine de pin. L'objectif de cette thèse est de mettre en évidence les atouts d'une médecine traditionnelle longtemps oubliée/ignorée. Celle-ci est illustrée par les activités d'un extrait aqueux lyophilisé de résine de pin recueilli dans la région de Oued Sebt (Hammam Guergour, Sétif) au Nord-Est de l'Algérie.

Une première approche consiste à déterminer les principaux composants de cet extrait aqueux lyophilisé par GC/MS ainsi que son pouvoir antioxydant.

Ensuite les capacités antimicrobiennes ont été recherchées. Une évaluation de l'activité antifongique a été menée, plus précisément anti dermatophyte. En plus d'une évaluation antibactérienne par la mise en évidence du pouvoir antiquorum sensing de cet extrait.

Pour cela, une synthèse bibliographique a été consacrée à la résine de *Pinus halepensis* Mill., et aux systèmes QS chez les bactéries ; et plusieurs approches expérimentales ont ensuite été retenues.

Revue bibliographique

Chapitre 1er La résine de *Pinus halepensis* Mill.

1.1. Répartition du pin d'Alep dans le bassin méditerranéen

Le pin d'Alep ou *Pinus halepensis* représente une essence forestière de première importance dans le bassin méditerranéen par la superficie qu'il occupe et le rôle qu'il joue dans l'économie des pays de cette région (Nahal, 1962 ; Quezel, 1986). Ces pins du groupe «*halepensis*» occupent une place considérable et représentent près de la moitié des peuplements forestiers notamment au Maghreb et en Anatolie (Quezel, 1986). Dans le bassin méditerranéen (figure1), les forêts de *Pinus halepensis* Mill. occupent plus de 3,5 millions d'hectares (Quezel et Barbero, 1992 ; Demirci *et al*., 2015).

L'inventaire des terres et forêts de l'Algérie réalisé en 1984 estime à 1128664 ha la surface occupée par les principales essences forestières ligneuses ayant un intérêt économique. Parmi ces essences, le pin d'Alep occupe 881300 ha (Bensaid *et al*., 1998).

Le pin d'Alep est la seule essence résineuse pouvant être utilisée avec un succès assuré dans l'étage méditerranéen inférieur en sol calcaire (Debazac et Tomassone, 1965). Une éventuelle fonction de la résine réside dans la protection des feuilles et notamment des bourgeons contre les extrêmes environnementaux. Les niveaux d'eau disponible sont faibles face à des taux d'évapotranspiration élevés et une température élevée des feuilles en raison de niveaux élevés d'insolation (Dell et McComb, 1979).

Figure 1. Répartition de *Pinus halepensis* et *Pinus brutia* sur le pourtour méditerranéen (Quezel et Barbero, 1992)

1.2. Importance historique et culturelle des résines

Les résines ont joué un rôle important dans les civilisations du monde entier. Les anthropologues ont affirmé qu'aucun autre matériau n'était aussi polyvalent dans le monde préindustriel que la résine. Les résines se conservent bien en voyage et ont été échangées entre les sociétés du monde entier (figure 2). Un commerce d'encens étendu et rentable par les Arabes était en cours d'au moins 1000 av. JC, et l'encens était utilisé par les Maya et les Scythes à 600 av. JC (Langenheim, 2003). Selon Hippocrate (Ghedira et Goetz, 2011), la résine de pin était utilisée dans le traitement des ulcères ; en cataplasme, les raclures de pin sont préconisées pour le traitement des colopathies sanglantes ; la fumigation d'écorce de pin était employée dans les affections gynécologiques.

1.3. Utilisations et modes de préparation de la résine de pin

Outre ses nombreuses applications industrielles, la résine de pin a des propriétés médicinales. Les utilisateurs recherchent toujours la méthode la plus simple pour préparer des plantes médicinales, les plus fréquentes étant la décoction, l'infusion, le cataplasme, la fumigation et la poudre (Chohra et Ferchichi, 2019). La prédominance de ces méthodes de préparation a également été observée à Constantine par Ouelbani *et al*. (2016). Cependant, Benarba *et al*. (2015) ont rapporté la prédominance de la décoction.

La résine de pin est utilisée en poudre, mélangée avec du miel pour soigner les maladies de l'estomac et des intestins en Turquie. Elle est aussi mâchée pour nettoyer la bouche et les dents et pour éviter la mauvaise haleine. Elle sert comme antidiabétique et pour traiter les ulcères du tube digestif et les blessures (Satil *et al*., 2011). La résine de pin a des effets diurétiques, émollients, stimulants, antiseptiques, anthelminthiques, insecticides, désinfectants, cytotoxiques, antibactériens, antifongiques, spasmolytiques, cicatrisants,… (Shuaib *et al*., 2013; Rashid *et al*., 2015).

Mélangée de manière traditionnelle sous forme de baume avec la (graisse/beurre) ou de manière «moderne» (formulée à base de baume) en Norvège, la résine de *Picea abies* a montré des activités antifongiques (Rautio *et al*., 2012).

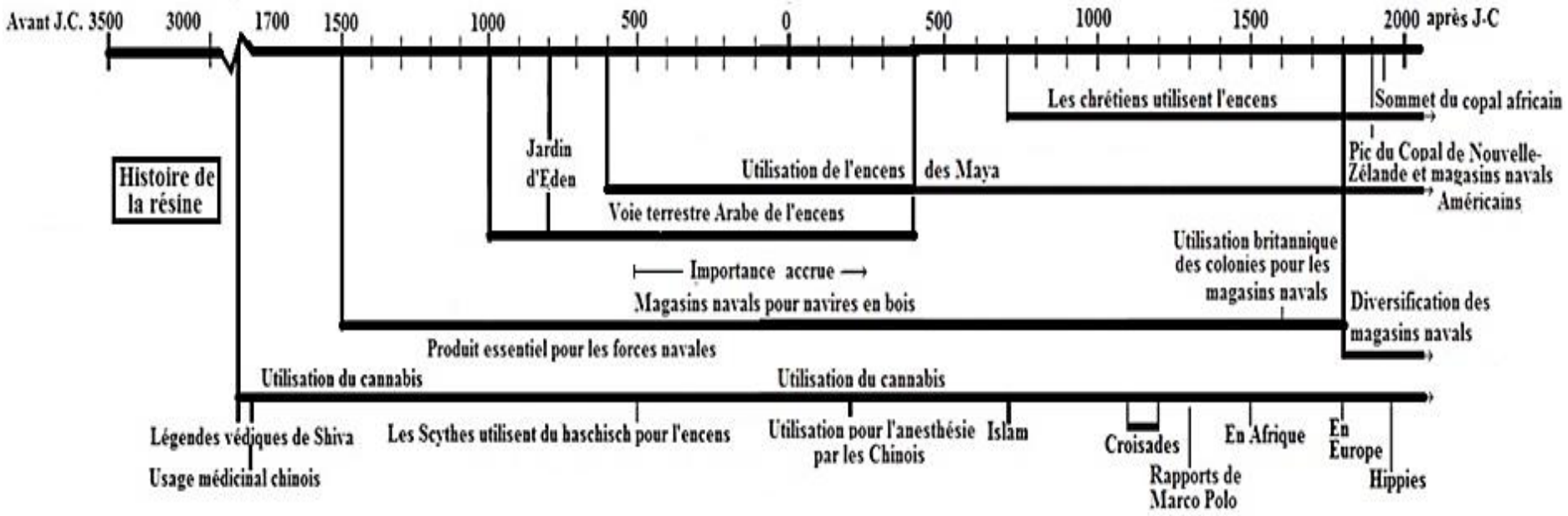


Figure 2. Chronologie des événements importants dans l'histoire de l'utilisation humaine de la résine (Langenheim, 2003)

La chronologie commence avec la période où les routes commerciales étaient bien établies

La résine de diverses espèces de *Pinus* donne par distillation la térébenthine et la colophane, cette dernière étant le produit principal (Ciesla**,** 1998). La térébenthine provenant de *P. halepensis* dans la région méditerranéenne a été utilisée pour traiter le catarrhe, la toux, la dysurie, la gonorrhée, le rhumatisme, la variole, les ulcères et la syphilis (Langenheim, 2003).

La résine de *Pinus halepensis* Mill. est utilisée en Algérie pour traiter les affections des voies respiratoires (Benderradji *et al*., 2015 ; Chermat et Gharzouli, 2015 ; Chohra et Ferchichi, 2019 ; Miara *et al*., 2019) et urinaires (Benderradji *et al*., 2015 ; Miara *et al*., 2019), la parasitose délirante (Miara *et al*., 2019), comme antiseptique (Benderradji *et al*., 2015 ; Chermat et Gharzouli, 2015 ; El Omari *et al*., 2020), antifongique (Chermat et Gharzouli, 2015 ; El Omari *et al*., 2020) et stimulant des glandes surrénales (Benderradji *et al*., 2015). De nombreuses enquêtes ethnobotaniques ont indiqué l'utilisation des pommes, des feuilles, de l'écorce et de la résine de *P. halepensis* Mill., en médecine traditionnelle pour traiter différentes affections (le tableau I regroupe les principales enquêtes menées en Algérie).

La résine des bourgeons de *P. halepensis* Mill., a exercé un effet thérapeutique sur la cicatrisation des plaies (Menale et Muoio, 2014 ; Miara *et al*., 2019 ; El Omari *et al*., 2020). Les populations du Maroc utilisent aussi la résine de *P. halepensis* Mill., sous forme de poudre contre les troubles digestifs, respiratoires, cutanés, circulatoires et génitaux (Ouhaddou *et al*., 2015). Comme c'est le cas de la majorité des pays méditerranéens, en Espagne la gomme, la résine, les feuilles et le pollen sont utilisés comme expectorants et contre les abcès (Gras *et al*., 2019).

1.4. Propriétés écologiques des résines

Les résines peuvent représenter environ 30% du poids sec associé à une feuille mature, et sont beaucoup plus présentes dans les plantes des régions arides que dans celles des autres climats. Le bois dérivé d'arbres riches en résine est généralement plus durable que celui obtenu à partir d'arbres dépourvus de résine (Dell et McComb, 1979).

La plupart des conifères libèrent de la résine pour colmater les plaies l'invasion d'agents tels que les microbes pathogènes (Dell et McComb, 1979 ; Gifford et Foster, 1989 ; Ciesla, 1998 ; Trapp et Croteau, 2001) et les insectes (Trapp et Croteau, 2001) ; d'autres exsudent spontanément la résine des branches et des cônes (Ciesla, 1998).

La résine peut être utile aux organismes autres que les plantes qui la produisent, les abeilles collectent la résine et l'utilisent pour se protéger des champignons et des termites (Langenheim, 2003).

Tableau I. Utilisations ethnomédicinales de *Pinus halepensis* en Algérie

zone d'étude	**Parties utilisées**	**Mode de préparation**	**Utilisation traditionnelle**	**Références**
Nord-ouest de l'Algérie (Mascara)	Non rapporté	Non rapporté	Contre les maux d'estomac et les maladies de la peau	(Benarba *et al*., 2015)
Nord-Est de l'Algérie (Djebel Zdimm, Sétif)	Résine	Non rapporté	Désinfectant et antifongique, contre les troubles des voies respiratoires	(Chermat et Gharzouli, 2015)
Région de Hodna (Algérie)	Fruits	Infusion	Traitement de l'hypertension artérielle	(Sarri *et al*., 2012)
Djebel messaad, M'sila (Algérie)	Bourgeons, feuilles, et résine	Décoction et cataplasme	Traitement des voies respiratoires et urinaires, troubles des glandes surrénales, antiseptique	(Benderradji *et al*., 2014)
Région de Hodna (Algérie)	Fruits	Infusion et poudre	Traitement des hémorroïdes, tuberculose, ulcère et affections pulmonaires	(Sarri *et al*., 2015)
Nord-Est de l'Algérie	Graines	Décoction	Traitement des ulcères gastriques et intestinaux, infections respiratoires, infection de la prostate, stérilité et maux de dents	(Bouasla et Bouasla, 2017)
Est de l'Algérie (Belezma Parc National de Batna)	Racines	Décoction	Traitement des troubles respiratoires	(Chohra et Ferchichi, 2019)
Nord-Est algérien (Région de Bordj Bou Arreridj)	Feuilles et résine	Infusion et décoction	Traitement des affections respiratoires (bronchite, pneumonie et rhume), problèmes urinaires, parasitose et plaies	(Miara *et al*., 2019)
Région de Tessala (Algérie)	Non rapporté	Fumigation	Traitement de la toux	(Nazim *et al*., 2020)
Montagnes Nord-Est de Dahra (Région de Bissa, Algérie)	Graines	Non rapporté	Traitement des maux d'estomac et des reins, inflammation	(Senouci *et al*., 2019)

2nd Chapitre Quorum Sensing

2.1. Définition du Quorum Sensing (QS)

Les microorganismes sont fréquemment confrontés à des changements brusques dans leur environnement. Les bactéries, organismes vivants les plus anciens sur terre, sont malgré leurs simples structures capables de coopérer en tant qu'organismes multicellulaires et d'exécuter efficacement un large éventail de comportements collectifs (Kalia et Purohit, 2011 ; Kalia, 2013) par un contrôle de la population (Rutherford et Bassler, 2012 ; Rai *et al*., 2015). Ce processus est basé sur un mécanisme de communication bactérienne connu sous le nom de quorum sensing (QS) ou détection de quorum (Kalia et Purohit, 2011) ou détection de densité (Zhao *et al*., 2020). Le QS est un mécanisme de communication «cellule à cellule» entre bactéries leur permettant de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire (Rutherford et Bassler, 2012 ; Rai *et al*., 2015).

2.2. Communication cellulaire *versus* Développement du QS

Les bactéries pathogènes et opportunistes se développent et demeurent «silencieuses» tant que leur densité cellulaire est faible pour échapper au système immunitaire humain (figure 3). Quand un seuil de densité de la population est atteint, elles sont capables de le ressentir (Kalia, 2015) et les bactéries sécrètent alors de petites molécules semblables à des hormones diffusibles dans l'environnement extracellulaire. Ces molécules sont appelées autoinducteurs (AI) pour contrôler le comportement de l'ensemble de la population bactérienne (Whitehead *et al*., 2001 ; Kalia et Purohit, 2011 ; Zhao *et al*., 2020).

Le QS est régulé par ces petits signaux chimiques. A faible densité, l'AI reste non détectable mais une concentration élevée permet la détection et la réponse. La détection des AI est nécessaire pour provoquer l'expression et la répression, coordonnées, des gènes chez les bactéries (Miller et Bassler, 2001 ; Platt et Fuqua 2010 ; Zhao *et al*., 2020). La perception des AI peut être intracellulaire, par des régulateurs de transcription chez les Gram négatifs ou extracellulaire par des senseurs membranaires qui induisent une cascade de phosphorylation chez les Gram positifs (Kalia et Purohit, 2011 ; Mion *et al*., 2019).

Dans les deux cas, le QS provoque une activation de certains gènes propices à des comportements de groupe des bactéries. La modulation de l'expression des gènes par la détection du quorum provoque des changements phénotypiques chez les bactéries conduisant à une meilleure adaptation aux conditions environnementales et au stress pendant la croissance (Kalia et Purohit, 2011 ; Mion *et al*., 2019). L'expression des facteurs de virulence, la bioluminescence, la sporulation, la dispersion, la recherche de nourriture et la formation de biofilms ne sont que quelques exemples du comportement coordonné que les bactéries utilisent comme stratégie de survie dans des environnements hostiles (Kalia et Purohit, 2011).

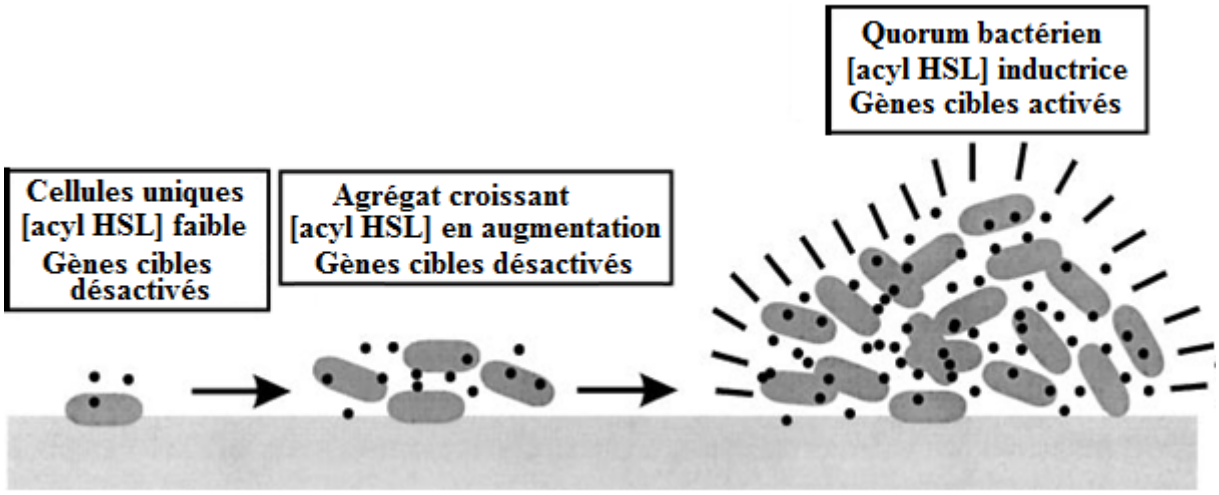


Figure 3. Régulation des gènes dépendante de la densité de population
(Fuqua *et al*., 2001).
Les points pleins noirs représentent les signaux du quorum

La signalisation cellule-cellule se fait en trois étapes (Podbielski et Kreikemeyer, 2004) :

-a- D'abord, une molécule de signalisation spécifique à la cellule est produite à l'intérieur de la cellule bactérienne et est transportée à travers l'enveloppe bactérienne. A l'extérieur, elle diffuse souvent dans l'environnement ou moins souvent, reste liée à la surface de la cellule productrice. Certaines molécules pourraient même provenir de la surface bactérienne, de l'environnement ou de facteurs hôtes et pourraient être libérées en raison de l'activité d'une enzyme de transformation produite par la bactérie.

-b- Dans la seconde étape, les signaux moléculaires s'accumulent à l'extérieur des bactéries. L'accumulation est due à la production des molécules à un taux constant et à un nombre croissant de bactéries dans un volume donné. Par conséquent, il y a une diminution de l'espace disponible pour les bactéries et les molécules de signalisation (par exemple l'absorption dans les phagosomes), et une apparition de structure imperméable en étroite proximité des bactéries (par exemple la matrice extracellulaire des tissus hôtes).

-c- La troisième étape consiste en une détection des signaux moléculaires par les bactéries.

Les bactéries peuvent utiliser des systèmes à deux composants «capteur/régulateur». Dans de tels systèmes, un capteur membranaire lie spécifiquement le signal moléculaire à la surface externe des bactéries et n'interagit alors spécifiquement qu'avec une protéine régulatrice intracellulaire ; les molécules de signalisation diffusent passivement à travers la membrane ou sont transportées activement dans la cellule bactérienne. A l'intérieur, les AI se lient spécifiquement à une protéine régulatrice. La détection des molécules de signalisation peut commencer dès que les molécules sont modifiées et / ou exportées de la bactérie productrice. Lorsque la concentration extracellulaire ou, après recapture, intracellulaire des molécules atteint un niveau seuil prédéfini, la détection de ces composés se traduit par l'expression de quelques ou plusieurs centaines de gènes (Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

2.3. Classes d'autoinducteurs

Les mécanismes du QS diffèrent considérablement d'un organisme à l'autre, selon les caractéristiques de la bactérie (Gram positif ou Gram négatif), le type de molécules de signalisation et le système de transduction du signal utilisé. Il existe une grande diversité de molécules de communication entre bactéries. Selon ces molécules auto-inductibles, les systèmes QS bactériens sont divisés en trois types. L'un est le système QS basé sur l'acyl-homosérine lactone (AHL) comme auto-inducteur chez les bactéries à Gram négatif. Les autoinducteurs de QS des bactéries Gram-positives sont des oligopeptides. Les autres types sont des systèmes QS utilisant des diesters de borate de furanne comme molécules auto-inductrices et existent chez les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif. Le QS sert non seulement au recensement de la population bactérienne, mais aussi à la perception de la diffusion des facteurs sécrétés dans le milieu, pour optimiser l'efficacité de leur production (Zhao *et al*., 2020).

2.3.1. Les autoinducteurs 1

Les autoinducteurs 1 (AI-1) sont des dérivés d'acides gras, il s'agit d'acyl homosérine lactone dont les tailles de la chaîne acyle varient selon les bactéries (de 4 à 18 atomes de carbone) et les substitutions (oxo ou hydroxy) au 3ème carbone dans cette chaine. Les AHL ont un cycle homosérine lactone connecté par une liaison amide à une chaîne acyle variable. Le QS de type AHL se produit principalement chez les bactéries à Gram négatif et intervient principalement dans la signalisation intra-espèce (Miller et Bassler, 2001 ; Rutherford et Bassler, 2012).

Les AHL sont des composés amphiphiles synthétisées par des AHL synthétases intracellulaires de type LuxI chez plusieurs bactéries par une réaction d'acylation de la S-adénosyl-méthionine (SAM), source de formation du cycle homosérine lactone, et de la protéine porteuse d'acyle (ACP ou acyl carrier protein), source de la chaîne latérale d'acide gras (Pearson *et al.*, 1999; Rutherford et Bassler, 2012).

À faible densité cellulaire, les bactéries produisent un niveau basal de LuxI, qui à son tour produit un niveau basal d'AHL. L'AHL s'accumule proportionnellement à l'augmentation de la population bactérienne (Rutherford et Bassler, 2012). Les AHL se déplacent à travers les membranes bactériennes *via* des pompes à efflux ou par diffusion passive (Pearson *et al.*, 1999). Généralement, l'AHL à courte chaîne diffuse passivement à travers les membranes bactériennes et s'accumule dans l'environnement et les AHL à longue chaîne nécessitent des mécanismes de transport actifs pour leur efflux (Schuster *et al*., 2004). Ces signaux ont des récepteurs spécifiques (Fuqua *et al*., 2001), qui à une concentration seuil se lient à une protéine activatrice transcriptionnelle de type LuxR et sont stabilisées par cette liaison; le complexe AHL-LuxR forme alors des dimères ou des multimères et active ensuite les gènes cibles (Rutherford et Bassler, 2012 ; Paluch *et al*., 2020).

2.3.2. Les autoinducteurs 2

L'autoinducteur 2 (AI-2) est un diester de borate de furanosyle. Il a été identifié pour la première fois chez la bactérie marine *Vibrio harveyi*. L'AI-2 est produit et reconnu par les bactéries à Gram positif et à Gram négatif et est impliqué dans le QS inter et intra espèces (Schauder *et al*., 2001 ; Rutherford et Bassler, 2012).

L'AI-2 est dérivé de la S-adénosylméthionine, il est synthétisé en deux étapes par deux enzymes spécifiques, Pfs et LuxS. La SAM, donneur de méthyle, produit l'adénosyl homocystéine qui est ensuite hydrolysée par une S-adénosylhomocystéine nucléosidase «Pfs». La Pfs produit alors l'adénine et la S-ribosyl homocystéine. Enfin, l'autoinducteur synthétase «LuxS» transforme la S-ribosylhomocystéine en 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). Le DPD linéaire est très instable et peut subir une cyclisation spontanée formant une variété de dérivés qui s'interconvertissent appelés pool AI-2. Chaque souche bactérienne reconnaît des dérivés DPD spécifiques. Cependant, l'interconversion des molécules au sein du pool AI-2 permet aux bactéries de répondre à leur propre AI-2 ainsi qu'à ceux produits par d'autres espèces bactériennes (Schauder *et al*., 2001 ; Rutherford et Bassler, 2012).

Utilisée par un large spectre de bactéries, la signalisation LuxS / AI-2 sert pour la communication interspécifique avec les membres d'autres espèces (Schauder *et al*., 2001 ; Rutherford et Bassler, 2012).

2.3.3. Les autoinducteurs peptidiques

Le QS chez les Gram positifs repose sur l'auto-induction par de petits peptides linéaires ou cycliques d'environ 5 à 17 acides aminés. Ce sont des molécules intracellulaires qui interagissent avec des récepteurs membranaires afin d'éviter la dégradation par des peptidases intracellulaires (Rutherford et Bassler, 2012 ; Ganin *et al*., 2015). Ce sont des signaux spécifiques à l'espèce et à la souche qui semblent n'avoir qu'une seule fonction, celle de la signalisation (Fuqua *et al*., 2001).

Les autoinducteurs peptidiques (AIP) sont synthétisés dans les cellules bactériennes en tant que précurseurs (pro-AIP) et excrétés hors de la cellule par des transporteurs d'AIP spécialisés, liés à la membrane appelés transporteurs ABC ou transporteurs à ATP Binding Cassette (Rutherford et Bassler, 2012 ; Paluch *et al*., 2020). Pendant le transport du pro-AIP à travers la membrane, les transporteurs se lient aux signaux peptidiques (Rutherford et Bassler, 2012).

A l'extérieur de la cellule bactérienne, les AIP sont perçus par un senseur membranaire à histidine kinase (HK) d'autres bactéries. Les AIP sont souvent spécifiques de leurs récepteurs apparentés. Aux niveaux de concentration seuil dans l'environnement extracellulaire, le signal peptidique se lie et active le capteur protéique HK situé dans la membrane cellulaire de la bactérie (Rutherford et Bassler, 2012 ; Monnet et Gardan 2015).

La kinase est activée par phosphorylation, le groupement phosphate est transféré au régulateur cytoplasmique de transcription. Lors de la libération du récepteur HK, les AIP sont recyclés dans le cytoplasme cellulaire entraînant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles associés au QS (Reading et Sperandio, 2005 ; Rutherford et Bassler, 2012 ; Monnet et Gardan 2015 ; Paluch *et al*., 2020).

Les AIP de diverses espèces ou souches d'une même espèce diffèrent par leur taille, les séquences et souvent par des modifications post-traductionnelles telles que l'induction de cyclisations internes dues à la formation de thioester. Les enzymes à action post-traductionnelle sont situées dans la membrane cellulaire et sont actives pendant le transport des molécules vers l'extérieur. Cette compartimentation permet à la cellule productrice de signal de différencier une molécule signal qui vient d'être produite d'une autre prélevée dans l'environnement (Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

2.4. Régulation du QS

Il semble que la régulation QS soit utilisée dans tout le règne bactérien et repose sur des classes définies de molécules chimiquement diverses. Étant donné que les bactéries existent le plus souvent dans un biofilm et que la plupart des biofilms contiennent de nombreuses et différentes espèces bactériennes. Ces bactéries peuvent faire la distinction entre leurs propres molécules de signalisation et celles d'autres souches ou espèces à l'intérieur du même biofilm par la spécificité de liaison entre la molécule de signalisation et le récepteur apparenté. Pour atteindre cette spécificité, les molécules de signalisation (à l'exception des AI-2) présentent un degré élevé de variabilité de séquence et / ou de structure (Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

Les AHL de différentes espèces ou souches, diffèrent par la longueur et / ou l'origine chimique de leurs chaînes latérales lipophiles. Ainsi, même des cellules uniques de *Pseudomonas aeruginosa* produisent et détectent spécifiquement différents types de molécules AHL en parallèle (par exemple les AI des systèmes QS Las et Rhl). De telles molécules de signalisation induisent des circuits de régulation se chevauchant parfois synergiques et parfois antagonistes qui sont évidemment nécessaires pour affiner l'expression de facteurs de virulence particulièrement sécrétés, tels l'élastase ou la protéase alcaline (Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

De plus, le QS contrôle une grande variété de phénotypes procaryotes (tableau II), notamment la sécrétion d'enzymes, bioluminescence, développement de biofilms (Whitehead *et al*., 2001 ; Rutherford et Bassler, 2012), motilité, production et résistance aux antibiotiques, formation de spores, production de toxines, transfert de matériel génétique, etc. (Fuqua *et al*., 2001 ; Zhao *et al*., 2020) et même des facteurs environnementaux tels que la diffusion et le confinement (Platt et Fuqua, 2010).

Tableau II. Différents facteurs de virulence utilisés au cours de l'infection (Ben Haj Khalifa *et al*., 2011 ; Viswanathan *et al*., 2015)

Facteurs de virulence	**Mécanisme de virulence et effets induits**
Pili, Fimbriae et Flagelle	Adhésion aux muqueuses, mobilité : rôle dans l'internalisation et diffusion bactérienne (ex *P. aeruginosa*)
Adhésines non fimbriales, Formation de bioflm	Liaison étroite aux cellules hôtes, communautés bactériennes multicouches
Variation des antigènes de surface	Empêche la réponse des anticorps
Invasines	Forcer les cellules non phagocytaires à engloutir les bactéries
Liaison aux cellules M	Les cellules M du tissu lymphoïde associé aux muqueuses utilisées comme porte d'entrée naturelle dans le corps
Réarrangement de l'actine dans la cellule hôte	Mouvement de phagocytose forcé dans les cellules hôtes et propagation de cellule à cellule
Motilité et chimiotaxie	Atteindre la surface des muqueuses
Capsule	Empêcher l'absorption phagocytaire et réduire l'activation du complément
Lipopolysaccharide	Inhibition de la formation du complexe d'attaque membranaire et de la résistance sérique Stimulation de production de cytokines (ex *P. aeruginosa*)
Protéases sIgA	Empêcher le piégeage des bactéries dans la mucine
Peptidases C5a	Interférer avec la fonction de signalisation de la composante complémentaire C5a
Toxines (Exotoxine A de *P. aeruginosa*)	Tuer les phagocytes de l'hôte, inhiber la synthèse protéique des cellules cibles, mort cellulaire
Alginate	Provoquer le phénotype muqueux, adhésion aux cellules trachéales, résistance aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques, pathogénicité respiratoire (ex *P. aeruginosa*)
Exoenzymes S et U de *P. aeruginosa*	Effet cytotoxique, nécrose tissulaire, rôle antiphagocytaire, bactériémie voire un choc septique
Rhamnolipide	Effet détergent, hydrolyse du surfactant
Elastases (LasA+LasB) ex *P. aeruginosa*	Dégradation de l'élastine, la fibrine, l'interféron, le collagène et le complément
Protéase alcaline	Protéolyse, rôle dans les infections cornéennes
Pyocyanine-Pyoverdine (*P. aeruginosa*)	Libération d'élastase, inhibition des battements des cils, chélation de fer, synthèse de radicaux libres
Lectines solubles	Pathogénicité respiratoire, rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique, rôle dans l'infection aiguë et chronique

2.4.1. Régulation du QS chez les bactéries à Gram négatif

Les agents pathogènes cliniquement pertinents utilisent le QS pour réguler la production collective de facteurs de virulence dans plus de 100 espèces bactériennes à Gram négatif telles *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Brucella melitensis*, *Chromobacterium violaceum*, etc… (Schuster *et al*., 2004). Les systèmes QS sont basés sur le système de type LuxI / LuxR. Des systèmes homologues à LuxI / LuxR sont identifiés chez de nombreuses bactéries à Gram négatif, chacune capable de produire des AHL spécifiques (de Kievit et Iglewski, 2000).

Les AHL sont synthétisées à un niveau basal par les AHL synthétases (généralement homologues à la protéine de type LuxI). Les signaux AHL nouvellement synthétisés sont rapidement éliminés de la cellule vers l'extérieur par gradient de concentration. Une densité de population accrue peut élever la concentration locale de l'AHL. Bien que chaque cellule individuelle produise toujours de faibles niveaux d'AHL, le groupe synthétise globalement des concentrations plus élevées. À un niveau seuil, le signal AHL se lie à l'extrémité N-terminale d'un facteur de transcription (homologue à la protéine LuxR), et à son tour le facteur de transcription module l'expression des gènes régulés par QS. Souvent, les gènes cibles incluent le gène codant pour l'homologue LuxI, créant un circuit de rétroaction positive dans le capteur de quorum. Une comparaison des séquences d'acides aminés des protéines LuxR de différents genres bactériens révèle que l'identité de séquence dans la région définie comme site d'interaction LuxR-AHL est significativement plus élevée que l'identité de séquence globale (Fuqua *et al*., 2001).

2.4.1.a. Régulation QS chez *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est un gram négatif pathogène ubiquitaire opportuniste responsable d'infections aiguës et chroniques, l'une des bactéries les plus courantes dans les infections nosocomiales et potentiellement mortelles des personnes immunodéprimées (Hentzer *et al*., 2003 ; Schuster *et al*., 2004). En plus des pathogènes opportunistes, le genre *Pseudomonas* comprend des agents pathogènes des plantes, des agents de lutte biologique et des organismes bénéfiques sur le plan industriel (Aswathanarayan et Rai, 2015). Chez *P. aeruginosa*, jusqu'à 10% du génome est sous l'influence du QS responsable de la production de facteurs de virulence (Schuster *et al*.2004) tels l'élastase, l'exotoxine A, la pyocyanine, etc… (Reading et Sperandio, 2005 ; Ben Haj Khalifa *et al*., 2011).

La production de lectine et de rhamnolipides, l'essaimage, les toxines et la formation de biofilm sont d'autres facteurs de virulence codés par QS (Pesci *et al*., 1997).

La plupart des espèces gram-négatives pathogènes possèdent un seul système QS, basé sur l'AI, composé d'une AI synthétase et d'un régulateur de transcription. En revanche, *P. aeruginosa*, possède un système QS plus complexe (Ivanova *et al*., 2015). Cette bactérie utilise quatre régulateurs (figure 4) organisés de manière hiérarchique, afin d'avoir un mode de communication combinatoire et mettre en place une réponse précise aux signaux détectés et ainsi adapter le mode de vie le plus convenable à la survie bactérienne. Les systèmes Las et Rhl basés sur l'AHL (homologues à LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri*) sont les deux principaux systèmes QS utilisés par *P. aeruginosa* pour contrôler sa pathogénicité/virulence (Pesci *et al*., 1997; de Kievit et Iglewski, 2000; Schuster *et al*., 2004).

Un troisième signal intercellulaire, le PQS ou *Pseudomonas* quinolone signal (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone), régule également de nombreux facteurs de virulence (Wade *et al*., 2005). Le quatrième signal, le 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde, est un signal de communication intercellulaire nommé IQS (ou système QS intégré) capable d'intégrer des indices de stress environnementaux (Lee *et al*., 2013).

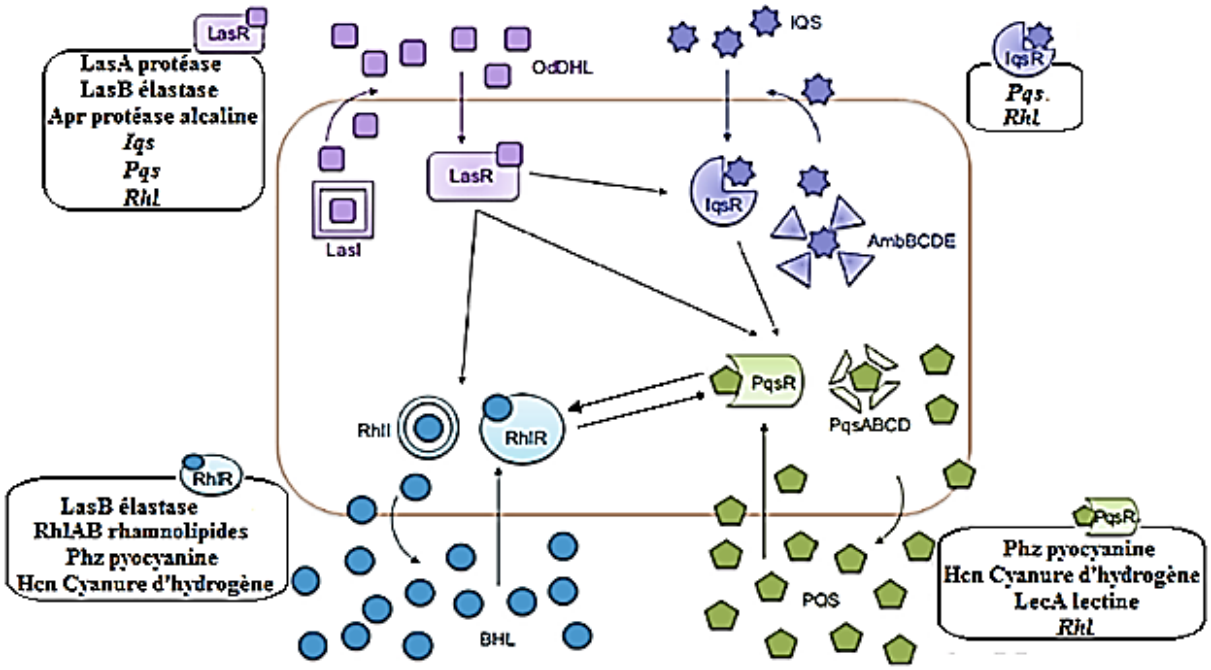


Figure 4. Représentation schématique des quatre réseaux de signalisation QS *chez P. aeruginosa* et de leurs régulons respectifs
(Lee et Zhang, 2015)
Les flèches indiquent un effet stimulant et les lignes perpendiculaires indiquent un effet inhibiteur.

Les systèmes LasI – LasR / RhlI – RhlR de *P. aeruginosa

L'un des systèmes QS de type LuxI / R les mieux caractérisés se trouve chez *P. aeruginosa* (figure 5) contenant deux systèmes QS de type LuxI / LuxR : LasI/LasR et RhlI/RhlR. Le système *las* est composé du régulateur transcriptionnel LasR et de l'autoinducteur synthétase LasI, qui produit la 3-oxo-C12-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL ou OdDHL), le ligand de LasR. RhlR est le régulateur transcriptionnel du système *rhl* et est associé à RhlI, qui produit son autoinducteur apparenté, la N-butyryl homosérine lactone (C4-HSL) ou BHL (de Kievit *et al*., 1999 ; Wade *et al*., 2005 ; Groleau *et al*., 2020).

L'expression de *lasR* dépend de la densité cellulaire de *P. aeruginosa* et est exprimé à un niveau basal jusqu'à ce qu'il soit induit pendant la seconde moitié de la phase logarithmique de croissance, l'expression devient maximale en phase stationnaire. L'expression de *lasR* est médiée par GacA (Ruimy et Andremont, 2004) et Vfr, ce dernier est l'homologue de la protéine du récepteur AMPc requise pour la transcription de *lasR* (Albus *et al*., 1997). Le système *las* est contrôlé positivement par GacA et Vfr et négativement par le produit du gène *rsaL* (Ruimy et Andremont, 2004).

Le système *las* détecte non seulement le quorum mais contrôle aussi la transcription de *rhlR*, ce dernier répond donc indirectement à la densité cellulaire *via* le système *las* et est directement contrôlé par LasR et OdDHL. L'expression maximale du *rhlR* dépend de OdDHL et / ou BHL pendant toutes les phases de croissance de *P. aeruginosa* (Pesci *et al*., 1997). LasR – OdDHL est le régulateur global de la virulence de *P. aeruginosa*. De plus, le contrôle de *rhlR* par le système *las* implique l'activité du système *las* avant le système *rhl*, indiquant qu'une hiérarchie existe entre les deux systèmes où la régulation *las* est dominante (Pesci *et al*., 1997 ; Koch *et al*., 2005). LasR est en fait le principal régulateur de la production de BHL, cependant RhlR régule le *rhlI* et la production de BHL essentiellement en l'absence de LasR (Groleau *et al*., 2020).

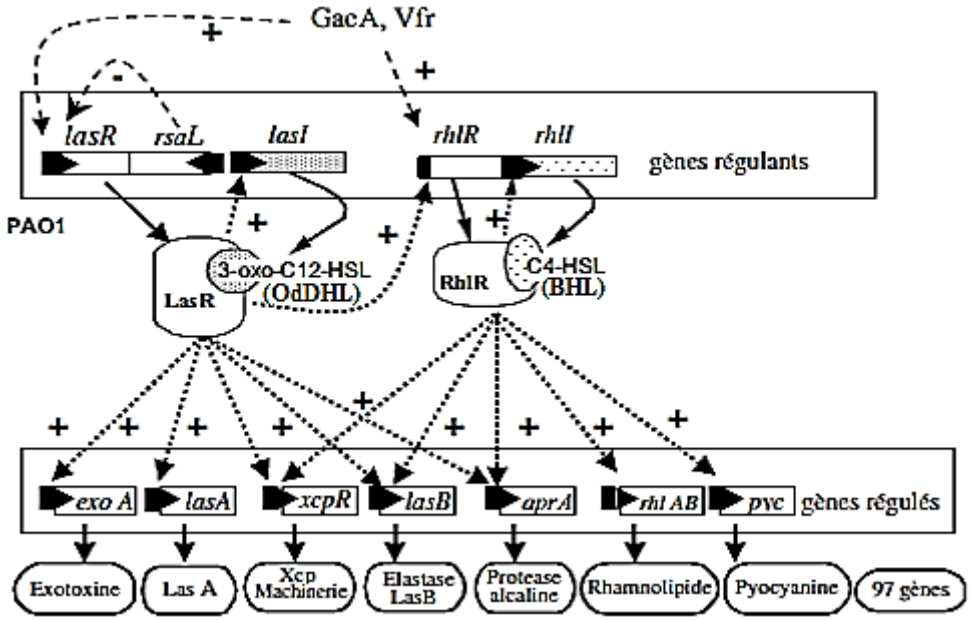


Figure 5. Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa* (Ruimy et Andremont, 2004)

La liaison de LasR aux promoteurs des gènes régulés par QS permet de contrôler plusieurs facteurs de virulence comme *lasB* (élastase), *lasA* (staphylolysine), *aprA* (protéase alcaline), *toxA* (exotoxine A), *hcnABC* (cyanure d'hydrogène synthétase) et *lasI*. Le circuit Las induit une boucle de rétroaction positive pour produire plus d'AHL et induit également un circuit QS secondaire «Rhl ». Ce dernier (Rhl) induit l'expression de *rhlAB* (rhamnolipides), *rhlI*, *lasB*, *rpoS* (le facteur sigma RpoS en phase stationnaire peut affecter l'expression de 40% des gènes régulés par QS), *lecA* (lectine de type I), *lecB* (lectine de type II), *hcnABC* et des gènes impliqués dans la production de pyocyanine (Winzer *et al*., 2000).

Bien que le système *las* soit au sommet de la cascade de signalisation QS de *P. aeruginosa*, provoquant les infections pulmonaires chroniques chez les malades atteints de fibrose kystique (Reading et Sperandio, 2006 ; Groleau *et al*., 2020), l'expression de *rhlR-rhlI* échappe parfois à la régulation LasR. Dans de nombreux isolats de mucoviscidose, Kostylev *et al*. (2019) ont démontré que l'ajout de BHL produite par *rhlI* ou de bactéries produisant la BHL, aux mutants *lasR* entraîne l'émergence rapide d'une population avec un système QS de type RhlI-RhlR indépendant de LasR. Ces auteurs suggérèrent une trajectoire évolutive pour le QS dans les fibroses kystiques à *P. aeruginosa* où les mutants *lasR* surviennent pendant l'infection parce que ces mutants sont entourés de *P. aeruginosa* produisant la BHL.

***Système PQS**

Le troisième système QS basé sur la 2-heptyl-3-hydroxy-4 (1H) -quinolone appelé PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal (McKnight *et al*., 2000 ; Schuster *et al*., 2004) n'est pas impliqué dans la détection de la densité cellulaire. La production et la bioactivité du PQS dépendent des systèmes *las* et *rhl* respectivement (McKnight *et al*., 2000) sachant que le système *las* active les systèmes *rhl* et *pqs* (Groleau *et al*., 2020). Le PQS est un lien entre les circuits Las et Rhl, l'expression du PQS nécessite LasR et le PQS induit à son tour la transcription de *rhlI*. Le PQS initie la cascade Rhl en permettant la production de l'autoinducteur dérivé du RhlI, seulement après la signalisation LasI / LasR (Miller et Bassler, 2001).

Le système PQS est constitué à partir du signal PQS, la PqsH synthétase et le régulateur de réponse PqsR (également appelé MvfR), lui-même est sous le contrôle de LasR-OdDHL (Dietrich *et al*., 2006).

La synthèse de PQS, signal intercellulaire, nécessite l'expression de plusieurs opérons, dont l'un est *pqsABCDE* (Wade *et al*., 2005), responsable aussi de la génération de plusieurs 4-quinolones dont la 2-heptyl-4-quinolone (HHQ), précurseur immédiat du PQS. La HHQ exportée est reprise par des cellules bactériennes adjacentes et convertie en PQS par une mono-oxygénase, la PqsH (Diggle *et al*., 2006).

PQS régule sa propre production par l'expression de *pqsABCDE via* une interaction directe avec PqsR (Diggle *et al*., 2006). La transcription de *pqsR* est positivement régulée par *lasR* et négativement régulée par *rhlR*. Une chaîne de régulation se produit alors où *pqsR* est sous le contrôle de LasR et RhlR, PqsR contrôle à son tour *pqsABCDE*, nécessaire pour la production de PQS (Wade *et al*., 2005).

Le PQS régule la production de déterminants de la virulence, notamment l'élastase, les rhamnolipides, la lectine (PA-IL) galactophile, la LecA et la pyocyanine et influence le développement du biofilm. Ainsi, la signalisation PQS joue un rôle important dans la pathogenèse de *P. aeruginosa* (McKnight *et al*., 2000 ; Diggle *et al*., 2006).

***Le système QscR**

Chez *P. aeruginosa*, le système QS contient deux ensembles complets LasI-LasR et RhlI-RhlR et un système incomplet, QscR qui n'a pas de protéine «I». QscR est un homologue orphelin de LasR-RhlR pour lequel il n'existe pas d'enzyme de synthèse acyl-HSL apparentée. L'OdDHL générée par LasI sert aussi de molécule signal pour QscR. Ainsi, *P. aeruginosa* possède deux AHL synthétases et trois récepteurs dont LasR et QscR pour la OdDHL produite par LasI synthétase. RhlR est le récepteur de BHL produite par RhlI synthétase (Lequette *et al*., 2006). Cependant, QscR montre une plus grande affinité de réponse aux AHL que LasR chez *P. aeruginosa* (Lintz *et al*., 2011).

QscR réprime de nombreux gènes induits par les systèmes LasI-LasR et RhlI-RhlR, les mutants QscR sont hypervirulents (Lequette *et al*., 2006 ; Choi *et al*., 2011). QscR peut : (i) se lier aux AHL et exercer un effet compétitif avec LasR et RhlR pour ces signaux ; (ii) agir de manière indépendante de l'AHL ; (iii) utiliser le signal produit par LasI ou RhlI ; (iv) ne se lie pas aux promoteurs dépendants de LasR ; (v) réprimer l'activation de gènes sensibles au QS dépendants de LasR et RhlR (Chugani *et al*., 2001) ; (vi) répondre aussi bien à la 3-oxo-C10-HSL qu'à la OdDHL ; (vii) répondre aux signaux produits par d'autres bactéries qui coexistent avec *P. aeruginosa* (Lequette *et al*., 2006). Cela pourrait être le résultat de la compétition pour le signal, la compétition pour les sites de liaison sur l'ADN régulateur ou la formation d'hétérodimères (Chugani *et al*., 2001). Il est possible que *qscR* et les gènes qui l'entourent soient des acquisitions dans le génome de *P. aeruginosa* (Lequette *et al*., 2006).

***Système QS intégré**

Le système QS intégré (IQS) appartient à la classe des signaux moléculaires QS, il s'agit du 2-(2-hydroxyphényl)-thiazole-4-carbaldéhyde. Les gènes impliqués dans la synthèse de l'IQS sont un groupe de gènes codant pour des peptides synthétases non ribosomales *ambBCDE*. L'interruption de l'IQS provoque une diminution de la production de signaux PQS et BHL, ainsi que des facteurs de virulence tels que la pyocyanine, les rhamnolipides et l'élastase. L'IQS est un puissant signal de communication intercellulaire par rapport à ses homologues puisque l'ajout de 10 nmol/l d'IQS aux mutants restaure entièrement ces phénotypes. L'IQS est étroitement contrôlé par LasRI. La perturbation de *lasR* ou de *lasI* abolit complètement l'expression d'*ambBCDE* et la production d'IQS (Lee *et al*., 2013).

Les quatre systèmes QS sont étroitement interconnectés (Winzer *et al*., 2000). Ces systèmes QS régulent des centaines de gènes de *P. aeruginosa* (Chugani et Greenberg 2010). *Las*, gouvernant l'expression des systèmes *pqs* et *rhl*, est au sommet de la hiérarchie QS (Winzer *et al*., 2000), active la synthèse de PQS, qui à son tour active l'expression de *rhlI*. De plus, LasR, RhlR et QscR influencent l'expression de gènes qui peuvent potentiellement modifier les niveaux intracellulaires de l'anthranilate, précurseur de la biosynthèse PQS (Chugani et Greenberg, 2010). Bien que le système *rhl* soit sous le contrôle de *las* et *pqs*, de nombreux facteurs de virulence QS-dépendants sont principalement activés par RhlR-BHL (Winzer *et al*., 2000). Ces systèmes représentent donc une cascade d'activation par étapes qui sera déclenchée par l'atteinte d'un «quorum» dans les cultures de *P. aeruginosa* (Lee *et al*., 2013).

Les facteurs environnementaux jouent aussi un rôle dans la modulation des systèmes QS bactériens et la plasticité des réseaux QS dans l'accommodation et l'exploitation des changements environnementaux au profit des agents pathogènes bactériens (Lee et Zhang, 2015).

2.4.2. Régulation QS chez les Gram positifs

Les conséquences de l'interaction des molécules de signalisation avec leurs récepteurs ne sont pas les mêmes chez toutes les bactéries. Chez les bactéries à gram positif, la liaison des molécules de signalisation active une protéine réceptrice en induisant une kinase. Le récepteur activé provoque une phosphorylation et ainsi l'activation d'une autre protéine intracellulaire, qui peut être un régulateur ou une autre kinase/phosphatase. Cette cascade de phosphorylation implique l'activation ultérieure de trois ou plusieurs kinases et protéines effectrices. De telles voies en cascade sont utilisées par les bactéries pour les processus d'amplification du signal (Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

2.4.2.b. Régulation QS chez *Staphylococcus aureus*

Le système QS de *Staphylococcus aureus* est l'un des systèmes les plus étudiés chez les organismes à Gram positif. Cette bactérie, l'un des organismes Gram positifs commensaux les plus courants chez l'homme, mais qui peut jouer un rôle essentiel dans de nombreuses infections souvent par formation de biofilms (Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

Ces infections disséminées sont associées à un changement de comportement de virulence des bactéries. Pour les infections superficielles (Podbielski et Kreikemeyer, 2004), et à faible densité cellulaire, les bactéries expriment les protéines nécessaires à l'attachement et à la colonisation, les adhésines et ainsi afficher un phénotype sessile (biofilm). L'augmentation de la densité cellulaire implique leur propagation, les bactéries doivent alors produire des enzymes lytiques (protéases) et des toxines (Novick, 2003 ; Podbielski et Kreikemeyer, 2004) mais pas d'adhésines, elles sont donc à l'état planctonique. Pour induire des infections profondes, les bactéries doivent retrouver leur caractère sessile. La commutation entre les deux états et la capacité de provoquer des infections métastatiques est principalement contrôlée par la régulation QS (Podbielski et Kreikemeyer, 2004). Celle-ci est assurée par le système «*agr*» (Novick, 2003). Le QS médié par l'AIP peut avoir un double rôle, dans la structuration des biofilms ainsi que dans leur dispersion (Boles et Horswill, 2008).

L'opéron *agr* est constitué de quatre gènes (Podbielski et Kreikemeyer, 2004). Le gène *agr*D de *S. aureus* code pour l'auto-inducteur peptidique «AgrD» (Novick, 2003). Au cours de son transport vers la membrane, AgrD est clivé du coté N terminal et du coté C terminal et AgrB (protéase associée à la membrane) ajoute ensuite un cycle thiolactone à ce peptide et le transporte hors de la cellule (Novick, 2003 ; Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

Le système *agr* (figure 6) répond à la concentration extracellulaire de l'AIP (Boles et Horswill, 2008). Quand la concentration d'AIP (phéromone AgrD) atteint un niveau critique, généralement d'ordre nanomolaire (Boles et Horswill 2008, 2011), l'AIP se lie à son récepteur, histidine kinase AgrC lié à la membrane pour activer ensuite le régulateur AgrA par phosphorylation (Novick, 2003 ; Podbielski et Kreikemeyer, 2004). La molécule AgrA activée induit directement ou indirectement la transcription de deux promoteurs en amont de l'opéron *agr*. L'activation de P2 active la transcription de celui-ci et l'activation de P3 augmente la transcription de l'ARNIII (Podbielski et Kreikemeyer, 2004). Ce dernier étant un ARN régulateur qui conduit à son tour à la répression (mécanisme antisens) des facteurs d'adhésion cellulaire (Novick, 2003), conduisant ainsi à une augmentation des cellules d'éssaimage d'un biofilm mature pour se retrouver sous forme planctonique complétant le cycle de vie du biofilm (Boles et Horswill 2008, 2011).

L'activation *agr* peut entraîner une augmentation des taux de protéases staphylococciques pour dégrader les protéines de surface cellulaires et perturber les interactions cellule-cellule dans le biofilm (Boles et Horswill, 2011).

De plus, l'activation du système QS «*agr*» peut induire l'expression de modulines de type surfactant solubles dans le phénol (PSM) jouant un rôle important dans la structuration et la dispersion des biofilms, mécanisme clé conduisant à la dissémination des infections impliquant des biofilms de staphylocoques (Periasamy *et al*., 2012).

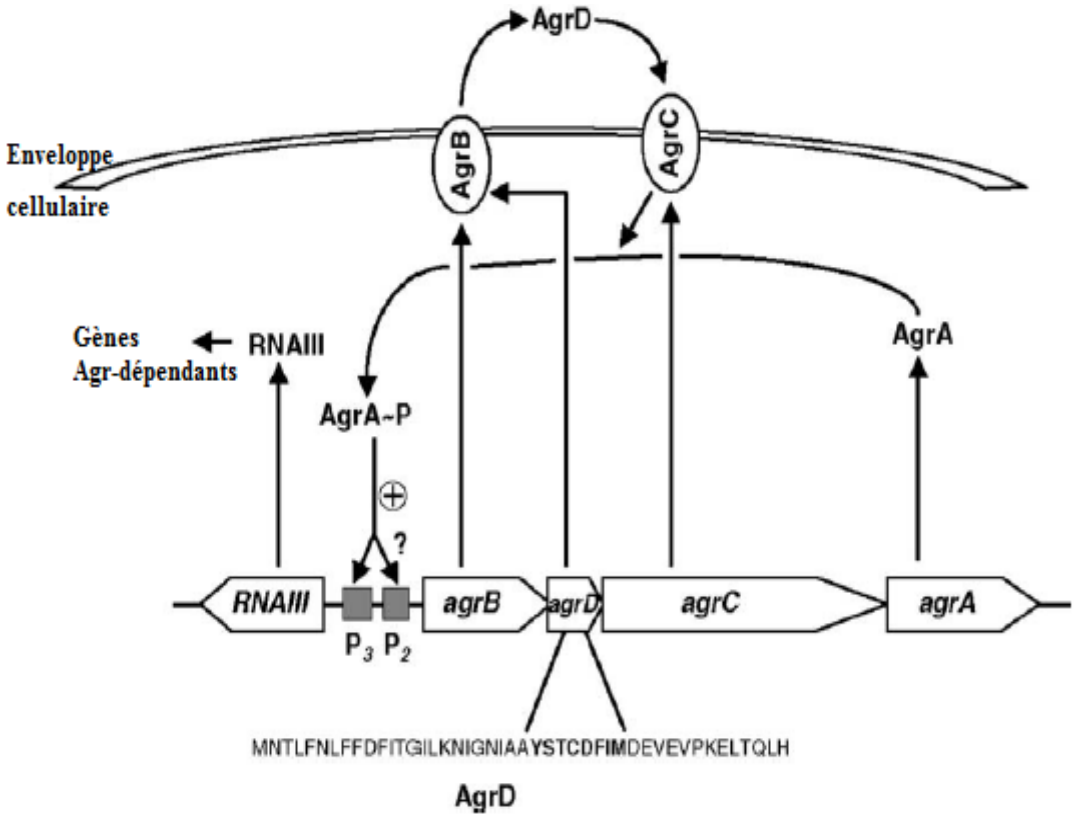


Figure 6. Voie générale de la régulation du quorum sensing pilotée par Agr chez les staphylocoques
(Podbielski et Kreikemeyer, 2004).

La spécificité du système *agr* est telle que non seulement les AIP non reconnus et les récepteurs ne se reconnaissent pas spécifiquement, mais chaque AIP réprimera également les autres AIP en se liant par compétition aux récepteurs non reconnus (Novick, 2003).

2.5. Quorum Quenching

Des perturbations du quorum sensing pourront inhiber la production de facteurs de virulence produits suite à la communication cellule-cellule chez de nombreuses bactéries (Mion *et al*., 2019 ; Paluch *et al*., 2020) et rend les agents pathogènes plus sensibles aux réponses immunitaires de l'hôte et aux antibiotiques (Jiang *et al*., 2019). Cette stratégie appelée quorum quenching (QQ) consiste en l'interruption du QS et peut agir au niveau extracellulaire par dégradation ou séquestration des molécules signal ou intracellulaire avec des inhibiteurs du quorum sensing (QSI) (Mion *et al*., 2019).

Les mécanismes interférant avec le QS peuvent être (Paluch *et al*., 2020):

- Application d'antagonistes des inducteurs.

- Inhibition de la synthèse des molécules AHL (blocage de la biosynthèse de la S-adénosyl-méthionine ou inhibition de LuxI).

- Dégradation enzymatique des molécules AHL : la lactonase hydrolyse le cycle HSL, l'acylase hydrolyse les liaisons amide, l'oxydoréductase réduit les groupes carbonyle ou hydroxyle.

- Inhibition de l'activation de la protéine histidine kinase par un inhibiteur de kinase.

- Blocage des cascades de transduction du signal par inhibition de la production d'ARN III en perturbant la liaison d'AgrA à l'ADN.

Partie pratique

Composition chimique de l’extrait aqueux de la résine de *Pinus halepensis* Mill.

1. Introduction

La composition chimique des plantes dans leur ensemble dépend de plusieurs paramètres tels que le lieu de croissance et de récolte, la répartition géographique, la partie de la plante utilisée pour l'extraction, les méthodes d'extraction ainsi que le protocole d'analyse spectrale (El Omari *et al*., 2020). Si les phytométabolites primaires répondent aux exigences de base de la plante, les phytométabolites secondaires tels les composés phénoliques, terpénoïdes, alcaloïdes, lignines, huiles essentielles, stéroïdes, tanins, etc... sont accumulés par les cellules végétales en quantités plus faibles que les métabolites primaires (Kumar, 2009 ; Kaur et Malik, 2014) et sont principalement destinés à l'autodéfense (Kaur et Malik, 2014). Les études chimiotaxonomiques impliquent l'utilisation de biomolécules, l'importance des plantes médicinales réside dans leurs principes actifs biologiques, véritables guérisseurs dans le processus de médication. Les plantes constituent donc une source renouvelable très importante de matières premières pour la fabrication de divers produits chimiques et médicaments (Kumar, 2009).

L'utilisation de *P. halepensis* Mill. dans différents domaines et son efficacité contre plusieurs pathologies selon les régions est due à la variabilité des composés bioactifs contenus dans cette espèce (El Omari *et al*., 2020). Les résines sont aussi chimiquement très diverses, ceci est dû à la variabilité des composés qui les constituent (Dell et McComb, 1979 ; El Omari *et al*., 2020), et qui peuvent être en grande partie composés de terpénoïdes (Iconomou *et al*., 1964 ; Schiller et Grunwald, 1986 et 1987 ; Mita *et al*., 2002 ; El Omari *et al*., 2020). Les composés terpénoïdes et phénoliques sont des métabolites secondaires ayant pour précurseurs les dérivés d'hydrates de carbone, comme le pyruvate, produits par photosynthèse (Langenheim**,** 2003). Certaines exsudations végétales dites oléorésines sont des mélanges de résine et d'huile comme chez le genre *Pinus* (Dell et McComb, 1979).

Les principaux constituants des résines naturelles sont :

Les huiles essentielles comme l'essence de térébenthine du pin. Elles sont constituées de composés volatils et contiennent en majorité des mono- et sesquiterpènes (hydrocarbures, alcools, esters, dérivés carbonylés, oxydes...), comme les α et β-pinènes (Delmond, 2002). Avec l'oléorésine qui constitue 21.3% de cette espèce en Algérie (Yassaa *et al*., 2000) et 96% en Grèce (Iconomou *et al*., 1964) ; l'α-pinène est le plus abondant composé de *P. halepensis* Mill. (Yassaa *et al*., 2000).

En général, l'huile essentielle de *P. halepensis* Mill. provenant des différents pays méditerranéens tels que l'Algérie, la Grèce et la Palestine sont riches en terpénoides tels que *β*-caryophyllène, *α*-pinène, *δ*-terpinène, myrcène, (+)-*δ*-3-carene, limonène, *β*-gurjunène, *β*-humulène, arcurcumène, *α*-muurolène, terpinolène, *γ*-terpinéol, et longifolène (Iconomou *et al*., 1964 ; Schiller et Grunwald, 1986 et 1987 ; Yassaa *et al*., 2000 ; Mita *et al*., 2002).

Les constituants acides tels les acides aliphatiques, les acides aromatiques et phénoliques combinés sous forme d'esters aux alcools résiniques. Cependant, ce sont les acides résiniques soit libres, soit combinés sous forme d'esters, qui forment souvent la majeure partie des résines, en particulier celles des conifères. La plupart d'entre eux sont des diterpènes. La colophane de diverses espèces de pin est constituée d'acides résiniques diterpéniques tricycliques appartenant à deux types de structure : les acides abiétadiénoïques (acide abiétique) et les acides pimaradiénoïques tels l'acide pimarique (Delmond, 2002).

Les constituants neutres, ce sont essentiellement des alcools résiniques, en majorité triterpéniques à l'état libre ou sous forme d'esters. La plupart d'entre eux sont de nature phénolique. En plus des polysaccharides, exclusivement rencontrés dans les gommes (Delmond, 2002).

L'analyse phytochimique des extraits de *P. halepensis* Mill. et de ses composés volatils montre une diversité de composés chimiques appartenant aux différentes classes citées ci-dessus, qui en plus des terpénoïdes, contiennent les flavonoïdes, les stéroïdes, les acides gras, les aldéhydes, les hydrocarbures, les cétones et les phtalates (El Omari *et al*., 2020).

L'extraction, lyophilisation et ensuite la détermination des composants de l'extrait aqueux de la résine de pin ont été réalisées selon les étapes qui suivent.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

La résine de pin a été récoltée de manière traditionnelle directement à partir de troncs d'arbre de pins dans la région «Oued Sebt» (Hammam Guergour, Sétif) au Nord-Est d'Algérie.

2.2. Préparation de l'extrait aqueux lyophilisé de résine de pin (EALRP)

L'échantillon a été préparé selon la méthode décrite par Gülçin *et al*. (2007) avec quelques modifications (temps d'ébullition) ; la résine de pin (1,9 g) est d'abord séchée à l'air puis broyée en poudre fine dans un mortier avec de l'azote liquide.

La poudre de résine est ensuite mélangée à 90 ml d'eau, ce mélange est porté à ébullition pendant 4h sous agitation magnétique.

L'extrait aqueux obtenu a été, respectivement, filtré à travers une compresse stérile et du papier Whatman N°1.

Le filtrat congelé à -20°C dans un congélateur à ultra-basse température est lyophilisé dans un lyophilisateur (Cryo Rivoire) sous une pression de 260 mTorr à -81°C ; à VEGENOV (St Pol de Léon, Brest, France).

2.3. Composition chimique de EALRP par GC/MS

L'identification des composants de EALRP a été réalisée en se basant sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC / MS) selon le mode opératoire décrit par Mansouri *et al*. (2011) avec quelques modifications (gaz vecteur, programmation de température).

Des échantillons de 5 mg de l'EALRP ont été mélangés à 50 µl de pyridine sèche et 75 µl de N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoracétamide, chauffés à 80°C pendant 20 min et analysés par GC-MS.

Cette technique est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard 6890 série II Plus lié au système de spectrométrie de masse Hewlett Packard 6972 équipé d'une colonne capillaire HP5-MS (30 m de long, 0,25 mm de diamètre intérieur ; épaisseur du film : 0,5 µm).

La température de la colonne est programmée de 100 à 325°C à raison de 5°C/min. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit réglé à 20 ml / min. Le mode d'injection est Split (ratio de split 50: 1, température de l'injecteur : 280°C). L'appareil est piloté par un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse.

L'identification des constituants de l'échantillon de résine a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention et des modèles de fragmentation des spectres de masse avec ceux de la bibliothèque des spectres.

Dans certains cas, où des spectres ne sont pas identiques, seul le type structurel du composant correspondant est proposé sur la base de sa fragmentation spectrale de masse.

Si disponibles, les composés de référence ont été co-chromatographiés pour confirmer les temps de rétention GC.

De plus, l'identification des composants de l'extrait est vérifiée par recherche dans la base de données NIST ou «National Institute of Standards and Technology» à l'aide des numéros CAS ou Chemical Abstracts Service (http://webbook.nist.gov/chemistry/).

3. Résultats et discussion

Les métabolites secondaires de *P. halepensis* Mill., sont variables en fonction de plusieurs facteurs, y compris les changements climatiques, l'origine géographique, les parties de la plante et les stades phénologiques. En effet, certaines études ont prouvé cette variabilité entre les différents lieux géographiques et suggèrent que la fluctuation de ces composés phytochimiques chez les plantes permet de répondre aux situations environnementales (El Omari *et al*., 2020).

L'analyse de la composition chimique de l'EALRP par GC/MS a permis d'identifier 53 composés. Les résultats les plus représentatifs selon la base de données NIST sont présentés dans le tableau III et la figure 7 (annexe).

Les composés aromatiques tels que les dérivés des acides, cinnamique et benzoïque représentent quantitativement la plus importante fraction. Parmi les composés phénoliques, l'acide caféique est le plus représentatif, constituant à lui seul 35,52%. L'ester méthylique d'acide salicylique et le 3,5-Bis (1,1-diméthyléthyl) catéchol sont respectivement représentés par 5.53 et 5.09%. La vanilline, le [1,1'-Biphenyl]-4,4'-diol, 3,3'-dimethoxy- (ou 4,4'-Biphenyldiol, 3,3'-dimethoxy-) et l'acide isoférulique sont représentés par 3.84, 3.05 et 2.73%. Alors que, la coumarine 3-(1,1-diméthylallyl)-7-hydroxy-6-méthoxy-) et l'acide *p*-salicylique (acide 4-hydroxybenzoïque) ont représenté 1.80 et 1.78%. Enfin, les composés les moins représentatifs sont illustrés par l'acide protocatéchuique et le thymol à 0.97 et 0.63% respectivement.

Auparavant, Karepova *et al*. (1983) avaient rapporté la présence dominante d'acides aromatiques (benzoiques) et aliphatiques tels que l'acide succinique dans l'extrait aqueux des aiguilles de *Pinus sylvestris.* Ces résultats sont cohérents avec les résultats présents car l'EALRP de *Pinus halepensis* est également riche en composés aromatiques et acides aliphatiques mono- et dicarboxyliques tels que les acides citrique, propanoïque et butanedioïque.

Les résines naturelles contiennent de l'acide succinique (aliphatique), acides benzoïque et cinnamique (aromatiques), les acides phénoliques comme les acides salicylique, *p*-coumarique et férulique (Delmond, 2002), l'acide hydroxycinnamique, un groupe d'acides résiniques comme les acides hydroxyabiétique et abiétique (Sipponen, 2013). Ces acides sont associés sous forme d'esters à des résines alcools (résinols et résinotanols) et à des composés phénoliques sous forme d'urushiol (Delmond, 2002).

Tableau III. Composition chimique de l'EALRP par GC/MS

Composés		**% aire**	**% Total des aires**
Acides aliphatiques	Acide succinique	0.58	0.58
Composés aromatiques et dérivés	2,6-Difluoroaniline ou 2,6-difluoro Benzénamine	0.58	64.57
	Vanilline	3.84	
	3',5'-Bis (trifluorométhyl) acétophénone	0.3	
	Acide 4-Hydroxybenzoique, acide *p*-Salicylique	1.78	
	Acide vanillique	1.00	
	Acide protocatéchuique	0.97	
	Coumarine, 3-(1,1-dimethylallyl)-7-hydroxy-6-methoxy-)	1.80	
	Acide isoférulique	2.73	
	Acide caféique	35.52	
	[1,1'-Biphenyl]-4,4'-diol, 3,3'-dimethoxy- (ou 4,4'-Biphenyldiol, 3,3'-dimethoxy-)	3.05	
	3-Méthyl-2-phenylindole	0.72	
	Thymol	0.63	
	Acide M-méthoxymandélique ou ester méthylique de l'acide salicylique	5.53	
	2-(1H-benzimidazole-2-yl) aniline	1.03	
	3,5-Bis(1,1-diméthyléthyl) catéchol	5.09	
Sucres et leurs alcools	Arabinose	2.69	6.45
	Xylitol	0.97	
	D-Xylopyranose	0.59	
	D-Glucose	2.20	
Alcaloïdes	Tétrahydroharman	0.87	0.87
Autres	Acide phosphorique	0.69	2.05
	D-Verbénone ou 2-Pinène-4-one	0.49	
	Ether de glycérol	0.87	

Les pins comme *Pinus roxburghii* (Sharma *et al*., 2016 ; Mir *et al*., 2018), *P. wallichiana* et *P. gerardiana* (Sharma *et al*., 2016) sont riches en alcaloïdes, phénols, saponines (Sharma *et al*., 2016 ; Mir *et al*., 2018), flavonoïdes (Sharma *et al*., 2016), glucides, glycosides (Sharma *et al*., 2016 ; Mir *et al*., 2018) et des polysaccharides (Delmond, 2002), phytostérols, terpènes et aussi des sulfates, fer, chlorures et nitrates (Mir *et al*., 2018).

De plus, l'analyse révèle la présence d'une variété de sucres représentant 6,45%, ces sucres sont probablement issus de l'hydrolyse des polysaccharides suite à l'ébullition de l'échantillon. Cet extrait aqueux contient également de l'acide phosphorique, de la D-verbénone et des alcaloïdes comme le tétra hydroharman. L'aire totale en pourcentage des composés identifiés en se référant à la base de données NIST, est de 74,52 % (Annexe).

L'EALRP contient en plus du matairésinol, un lignane très important. Testant des échantillons de résines naturelles de conifères et d'autres extraits de bois terpéniques Sipponen (2013), a trouvé régulièrement un groupe de lignanes spécialement le pinorésinol.

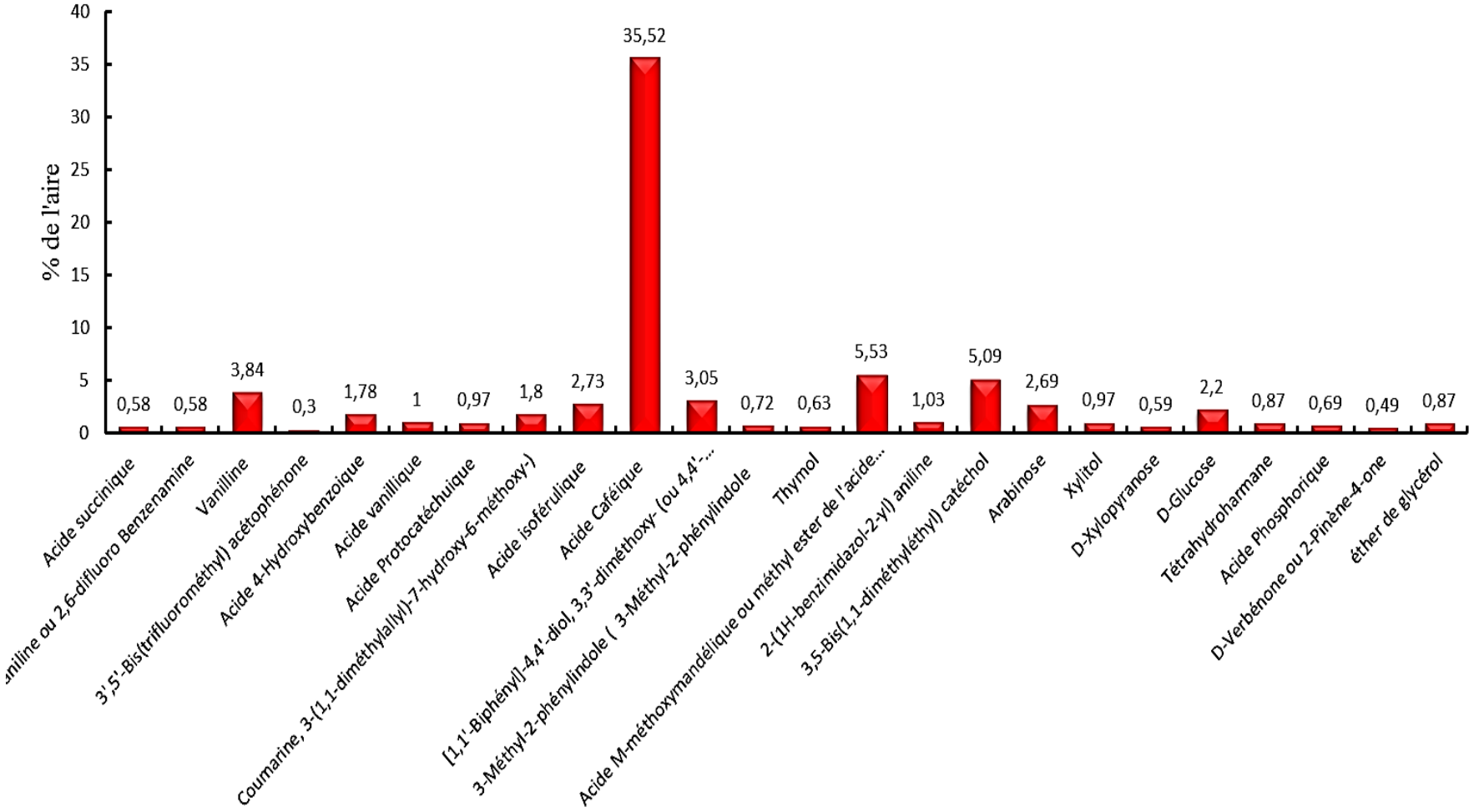


Figure 7. Taux des constituants majeurs de l'EALRP obtenus par GC/MS

Activité antioxydante de l’EALRP

1. Introduction

Des espèces réactives d'oxygène (ROS) telles que le radical anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène sont produites dans le corps humain par de nombreux systèmes enzymatiques *via* la consommation d'oxygène (Finkel, 1998). En raison de leur réactivité plus élevée que celle du dioxygène moléculaire, ils sont considérés comme potentiellement toxiques pour les cellules, notamment en raison de leurs lésions occasionnées dans l'ADN des cellules germinales, qui augmentent l'incidence des maladies génétiques et de l'incidence cancéreuse. Simultanément, ces ROS peuvent attaquer les lipides, les protéines et les glucides pour induire une oxydation, un clivage, une réticulation et une modification pouvant éventuellement causer d'importants dommages (Bhatia et Manish, 2009).

En petites quantités, ces ROS peuvent être bénéfiques en tant que transducteurs de signal. Les anions superoxydes et le peroxyde d'hydrogène, fonctionnent comme des seconds messagers intracellulaires (Finkel, 1998).

Les matériaux biologiques, surtout les membranes, contiennent une concentration élevée en acides gras polyinsaturés. En présence d'un initiateur de radicaux libres (tels que O_2^- ou OH^-) et d'O_2, ces acides gras peuvent être oxydés en alcanes, aldéhydes et hydroperoxydes. Cette peroxydation lipidique se produit dans les cellules végétales et animales. La peroxydation de l'acide linoléique à elle seule conduit à la formation d'au moins 20 produits de dégradation. La perte d'acides gras polyinsaturés conduit à des dommages considérables de la structure, la perméabilité et d'autres fonctions de la membrane cellulaire et à la libération concomitante d'enzymes lysosomales destructrices. Si ces hydroperoxydes ne sont pas éliminés, ils peuvent réagir avec des protéines essentielles inactives, des enzymes et des acides nucléiques et finalement provoquer des dommages irréversibles pouvant aller à la mort cellulaire (Bhatia et Manish, 2009).

Les organismes aérobies sont équipés de «systèmes de défense antioxydants» qui les protègent des effets néfastes de la peroxydation lipidique et d'autres manifestations de la toxicité de l'oxygène (Bhatia et Manish, 2009).

Ils sont classés en deux principaux groupes : (i) antioxydants enzymatiques : tels la superoxyde-dismutase, … ; (ii) antioxydants non enzymatiques comprenant les protéines se liant aux métaux, des molécules endogènes comme l'acide urique ou présents dans l'alimentation tels que les caroténoïdes, acide ascorbique, …. (Bhatia et Manish, 2009).

L'alimentation à base de plantes peut fournir des composés essentiels et des micronutriments utiles pour inhiber voire inverser les effets délétères des ROS (Longmore, 2007). Masquelier, (1987) a déposé un brevet pour l'utilisation d'un extrait à haute teneur en proanthocyanidines (flavonoïdes) se présentant sous forme d'un médicament et provenant de l'écorce de *Pinus* et à effet antiradicalaire. Cet extrait peut être utilisé pour lutter contre les effets biologiques néfastes des radicaux libres tels l'atrophie cérébrale, l'hypoxie consécutive à l'athérosclérose, l'infarctus cardiaque ou cérébral, la promotion tumorale, l'inflammation, l'ischémie, l'altération synoviale et la dégradation du collagène. Les extraits végétaux riches en proanthocyanidines sont dotés de «l'effet piégeur de radicaux» (Masquelier, 1987). Les oligomères de proanthocyanidines sont de puissants composés polyphénoliques antioxydants présents dans l'écorce de pin (Longmore, 2007). L'activité antioxydante de plantes est fortement liée à la teneur en polyphénols (Wojdylo *et al*., 2007; Moussaid *et al*., 2011). En effet, des extraits polyphénoliques et d'acide cinnamique d'essences de bois canadien et d'Oligopin® ont des activités antioxydantes vis-à-vis de différents radicaux libres tels H_2O_2, $O_2^{\bullet -}$ et $OH^{\bullet}$ (García-Pérez *et al*., 2010). Ils favorisent la santé cardiovasculaire et circulatoire périphérique et ont des effets anti hyperglycémiants et anticancéreux (Longmore, 2007).

L'objectif de ce chapitre est de démontrer les capacités anti oxydantes de l'extrait aqueux de la résine du pin d'Alep suite à la détermination/démonstration de sa richesse en composés phénoliques tels que l'acide caféique.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel

Dans ce test les produits chimiques utilisés sont de haut degré de pureté (high grade) obtenus de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA).

2.2. Méthodes

Deux méthodes ont été adoptées pour évaluer le pouvoir antioxydant de la résine de pin de la région Nord de Sétif. La méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et la méthode de blanchiment du β-carotène.

2. 2.1. Méthode au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de la résine de pin est évaluée selon la méthode au DPPH proposée par Chen *et al*. (2004) et Que *et al*. (2006).

2 ml d'une solution aqueuse de EALRP à différentes concentrations (solution mère 2mg/ml) et 2 ml de BHT (hydroxytoluène butylé) dans de l'eau distillée à différentes concentrations sont mélangés avec 2 ml d'une solution 0.1mM de DPPH dans du méthanol.

Le contrôle est préparé avec la même méthode mais la substance testée est remplacée par de l'eau distillée.

Après 30 min à l'obscurité, la décoloration du DPPH est mesurée à 517 nm avec un spectrophotomètre (Thermo-Scientific : HEʌIOS ° 490) en utilisant de l'eau distillée comme blanc. Tous les tests sont effectués en triplicata.

L'activité antioxydante de l'extrait est calculée en déterminant la diminution de l'absorbance à différentes concentrations en utilisant l'équation :

% d'activité antioxydante = [(Ac –Ae) / Ac] x 100

Où : Ac = (Absorbance du contrôle), Ae = (Absorbance de l'extrait testé).

Le graphique de la variation en pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations d'extraits testées permet de déterminer la CI50, concentration correspondant à 50% d'inhibition des radicaux DPPH, valeur comparée à celle enregistrée pour le composé de référence (BHT).

2.2.2. Méthode au β-carotène

Le test de blanchiment au β-carotène est réalisé selon la méthode décrite par Sun et Ho (2005) et Krishnaiah *et al*., (2011) avec quelques modifications (différences dans les concentrations des solutions).

Dans un flacon, 1 ml de solution de β – carotène (1 mg / ml de chloroforme pur) est ajouté à 25 µl d'acide linoléique et 200 mg du mélange émulsifiant Tween 40.

Après évaporation du chloroforme par un évaporateur rotatif (Rotamantle) à 42°C, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés sous forte agitation jusqu'à émulsification.

Ensuite, 10 ml de ce mélange sont transférés dans des tubes à essai contenant 2 ml d'eau distillée (témoin), 2 ml de solution de BHT (témoin positif, antioxydant standard) à 2 mg / ml de méthanol ou 2 ml de différentes concentrations de l'extrait testé ; tous les tests sont effectués en triplicata.

Dès que l'émulsion est ajoutée à chaque tube, l'absorbance au temps t=0 est mesurée à 490 nm par un spectrophotomètre (Thermo-Scientific: HEʎIOS ° 490), le blanc contient tous les composants de l'émulsion mais dépourvu de β –carotène.

Après incubation de l'émulsion pendant 2 h à 50°C, des mesures d'absorbance sont prises à intervalles réguliers (15 min) jusqu'à 2 h (β-carotène décoloré).

2.3. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD. Les graphiques ont été réalisés par le logiciel statistique Graph Pad Prism 8.4.2 (Graph Pad Software, USA). La signification statistique de la différence a été évaluée par une analyse de la variance à deux facteurs. Les différences ont été considérées comme significatives à $p<0.05$.

3. Résultats et discussion

Les méthodes du DPPH (Orhan *et al*., 2011) et du blanchiment du β-carotène (Krishnaiah *et al*., 2011) sont largement utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des substances (Krishnaiah *et al*., 2011 ; Orhan *et al*., 2011). Le DPPH est un radical libre de couleur pourpre agissant en tant que piégeur de radicaux libres ou donneur d'hydrogène; qui une fois réduit donne la diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune (Orhan *et al*., 2011) et peut être suivi spectrophotométriquement (Chen *et al*., 2004). La décoloration du β – carotène permet la mesure de l'inhibition de la production de composés organiques volatils et la formation de diénohydroperoxydes conjugués résultant de l'oxydation de l'acide linoléique par les ROS (Krishnaiah *et al*., 2011). Les antioxydants diminueraient l'étendue de la décoloration (Alam *et al*., 2013).

Les résultats des tests de l'effet de piégeage des radicaux libres de l'extrait aqueux lyophilisé de résine de pin (EALRP) sont présentés sous forme de graphes dans les figures 8 et 9.

3.1. Effet piégeur des radicaux DPPH par l'EALRP

Le DPPH est un radical azoté stable qui n'a aucune similitude avec les radicaux peroxyles hautement réactifs et transitoires impliqués dans la peroxydation lipidique. De nombreux antioxydants qui réagissent rapidement avec les radicaux peroxyles peuvent réagir lentement ou peuvent même être inertes vis-à-vis du DPPH en raison de l'inaccessibilité stérique (Prior *et al*., 2005). Le DPPH possède un électron non apparié sur un atome du pont azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, le DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH• (Popovici *et al*., 2009).

Les résultats des tests ont montré que l'EALRP (Figure 8) possédait une capacité assez significative de piégeage des radicaux libres en utilisant le test DPPH. Une inhibition maximale (93.76% ± 0.41) a été enregistrée à 300 µg / ml ; cependant, à 200 µg / ml, l'inhibition était déjà presque à son apogée (92.23% ± 0.13), et une CI_{50} de 83.64 µg / ml (R^2 = 0.9642). Alors que le contrôle positif BHT, a montré une CI_{50} de 45.11 µg / ml (R^2 = 0.9324). Il convient également de noter que le taux d'inhibition était supérieur à 90% à seulement 150 µg / ml et 200 µg / ml respectivement pour le BHT et l'EALRP ($p < 0.05$).

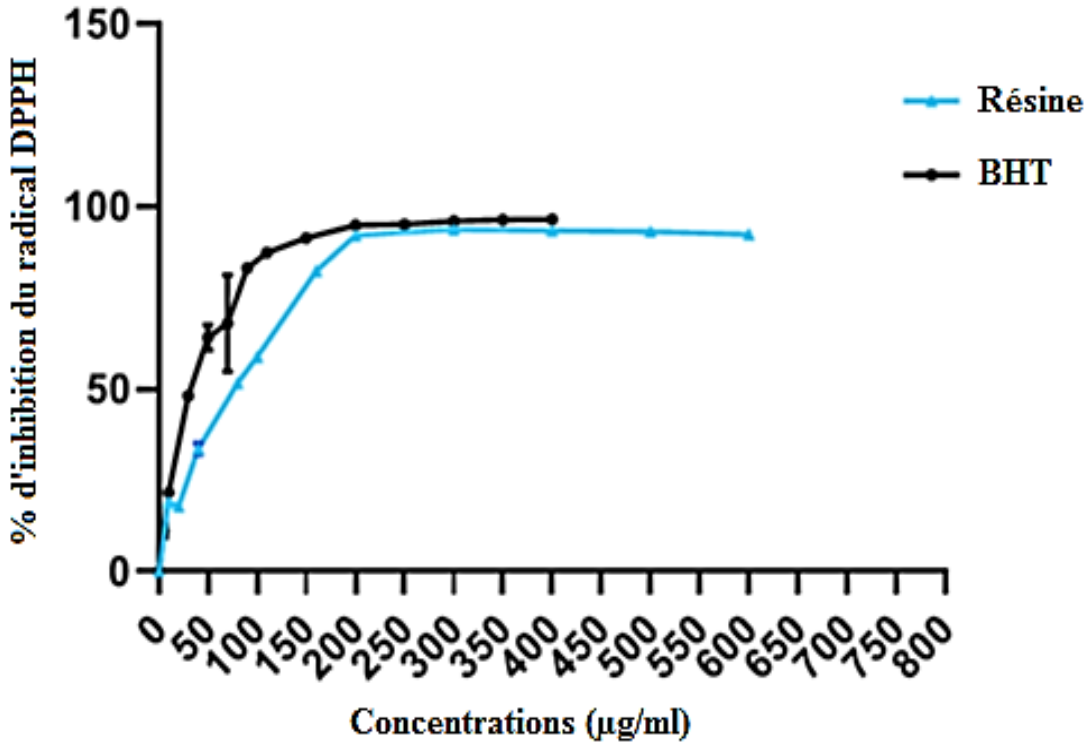


Figure 8. Taux de l'effet scavenger du DPPH par l'EALRP et le BHT

EALRP: extrait aqueux lyophilisé de la résine de pin; BHT: hydroxytoluène butylé

Les deux courbes ont un aspect similaire (figure 8). La résine de pin peut être considérée comme un produit assez important en raison de sa capacité à piéger les radicaux libres. La CI_{50} obtenue était proche de celle rapportée par Abbou *et al*. (2019) qui avaient utilisé l'extrait de graines de *P. halepensis* Mill. qui était riche en polysaccharides.

Le pourcentage d'inhibition a atteint 18.06 % à une concentration de résine aussi faible que 5 µg/ml. Cette capacité de piégeage augmentant avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de résine de pin. Cette augmentation proportionnelle à la concentration a aussi été signalée par Gülçin *et al*. (2007) lorsqu'ils décrivirent l'activité anti radicaux libres de l'extrait aqueux de feuilles de basilic (*Ocimum basilicum* L.).

En utilisant la même méthode Ulukanli *et al.* (2014) ont constaté que l'activité de piégeage des radicaux DPPH des huiles essentielles des résines de *Pinus pinea* et *Pinus brutia* (20 mg) et de l'α-tocophérol (10 g) étaient respectivement de 52.10, 76.33 et 65.7%. Auparavant, Gülçin *et al*. (2007) ont constaté que l'extrait aqueux de feuilles de basilic avait un effet piégeant du radical DPPH de 55 % à une concentration de 50 µg/ml. Alors que, García-Pérez *et al*. (2010) ont rapporté que l'extrait à l'eau chaude d'épinette noire était le plus efficace, montrant une capacité de piégeage élevée avec des IC50 48.30 et 1352.66 µg/ml respectivement, utilisant les méthodes de piégeage du peroxyde d'hydrogène et de l'oxide nitrique (NO). Dans une autre étude, les extraits aqueux de *Satureja calamintha* avaient montré un pourcentage d'inhibition supérieur à 90 % pour une concentration de 4.62 mg/ml (Bougandoura et Bendimerad, 2013). Avec une IC_{50} inférieure à 84 µg/ml, l'EALRP présente alors une bonne activité de piégeage des radicaux DPPH.

La capacité des extraits à piéger le H_2O_2 est fortement associée aux composés phénoliques totaux (Garcia-Pérez *et al*., 2010 ; Ulukanli *et al*., 2014), aux proanthocyanidines et aux acides cinnamiques issus d'essences de bois canadiennes et d'Oligopin® (Garcia-Pérez *et al*., 2010) ; et aux groupes hydroxyle des composés phénoliques de *Satureja calamintha* (Bougandoura et Bendimerad, 2013). Alors que, la capacité à piéger l'O_2^- était fortement corrélée avec les composés phénoliques totaux, la capacité à piéger l'OH était fortement corrélée avec la teneur en acides cinnamiques. Les auteurs suggérèrent que l'effet antioxydant global vis-à-vis du H_2O_2 et de l'O_2^- pourrait être dû à l'influence synergique des différentes classes phénoliques présentes dans les extraits (García-Pérez *et al*., 2010). L'EALRP contient des quantités importantes de composés aromatiques sous forme de dérivés d'acide cinnamique représentant 64.57% (Haichour *et al*., 2021a).

3.2. Test de blanchiment au β-carotène

Les résultats du test de blanchiment du β-carotène de l'EALRP (figure 9) montrent que la DO enregistrée à T = 0 min est plus élevée que celles enregistrées pour les autres intervalles de temps. La diminution de DO s'est produite entre 0 et 15 minutes puis est devenue plus lente pour la résine et le BHT. La diminution d'absorbance est cependant très marquée pour les témoins aqueux et méthanolique dépourvus d'extrait de résine suite à la disparition du β-carotène, l'oxydation de l'acide linoléique est au maximum après 60 min. Le BHT est apparu comme l'antioxydant le plus puissant ; l'EALRP a également montré un effet antioxydant remarquable et significatif en inhibant l'oxydation du β-carotène.

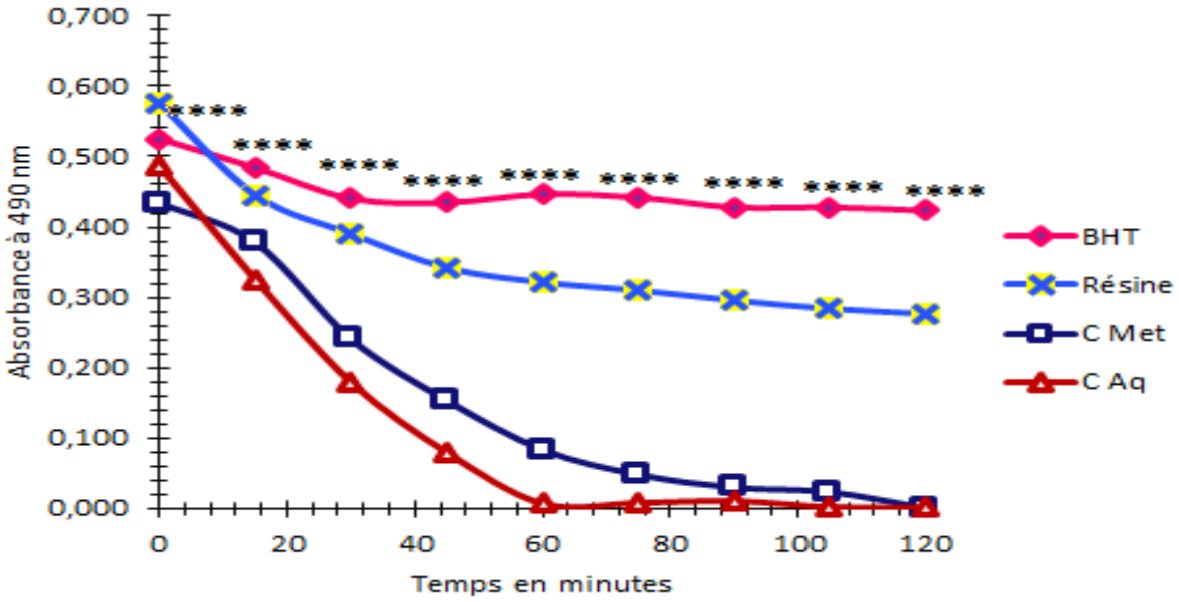


Figure 9. Activité antioxydante de l'EALRP par le test de blanchiment du β-carotène

EALRP : extrait aqueux lyophilisé de résine de pin ; BHT : Hydroxy toluène butylé ; C-Aq : Eau distillée ; C-Met : Contrôle méthanolique
**** : Différence hautement significative

Neacsu *et al*. (2007) ont isolé six flavonoïdes de bois noueux, deux glucosides flavonoïdes et un dérivé d'acide cinnamique du pin gris et du bois noueux du peuplier faux-tremble. Ces composés ont inhibé la peroxydation lipidique et ont piégé les radicaux peroxyles, leurs propriétés antioxydantes étaient proches de celles du Trolox (composé de référence). Des extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* ont inhibé la dégradation oxydative du β-carotène, les extraits de feuilles ont montré une meilleure activité anti-radicalaire car ils étaient plus riches en polyphénols (Kouamé *et al*., 2009).

Le pycnogénol est extrait de l'écorce de pin maritime français. Il est composé de bioflavonoïdes simples de la famille des proanthocyanidines, dimères et oligomères de ces simples proanthocyanidines, quelques acides aromatiques et organiques très utiles : caféique, cinnamique, fumarique, gallique, vanillique, férulique, protacatechuique et juste la bonne quantité de taxifoline. Le pycnogénol pourrait être utilisé comme antioxydant efficace pour protéger les cellules contre les lésions cellulaires induites par les rayons UVB. Il pourrait également être utilisé comme capteur de radicaux superoxydes pour protéger les cellules contre les lésions oxydatives induites par le superoxyde (Zink, 1996).

Très souvent, la réponse maximale est atteinte mais en augmentant la dose, la réponse s'estompe, devient négative et l'extrait semble inefficace. Cependant, cette inefficacité n'est pas le résultat d'une toxicité aiguë comme on pourrait le penser. Le comportement pharmacologique d'un extrait végétal peut être fluctuant et le dosage semble essentiel dans ce cas non pas pour éviter un accident dû à une dose toxique mais pour préserver l'efficacité des produits à base de plantes (Mortier).

Activité antimicrobienne de l'extrait aqueux lyophilisé de résine de *Pinus halepensis* Mill.

Mode d'action antibactérienne

1. Introduction

Les agents thérapeutiques médicinaux des plantes sont relativement sûrs et peu coûteux, ils peuvent constituer une alternative importante pour contrôler diverses maladies microbiennes, en particulier dans les cas de résistance (Taj Ur Rahman *et al*., 2016). Des médicaments à base de plantes étaient traditionnellement utilisés pour traiter la jaunisse, la toux, les ulcères, les plaies chroniques, la diarrhée, la dysenterie, la lèpre, les affections cutanées, la bronchite chronique, la syphilis, la coqueluche, les maladies génito-urinaires, les maux de gorge et la fièvre. Les indications thérapeutiques traditionnelles des plantes semblent présenter un assez bon degré de corrélation avec leur activité antimicrobienne spécifique (Ahmad et *al*., 1998).

Les pins ne sont pas exclus de la liste des plantes à caractère antimicrobien. Des extraits de *Pinus roxburghii, P. wallichiana* et *P. gerardiana* sont des antimicrobiens potentiels contre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* (Sharma *et al*., 2016). Parmi les extraits de bois de nœud et d'écorce de 30 espèces d'arbres efficaces contre *B. cereus* et *C. albicans*, ceux des espèces de *Pinus* se sont révélés très actifs (Välimaa *et al*., 2007).

Les résines de *P. merkusii*, *P. oocarpa*, *P. insularis*, *Agathis loranthifolia* sont très actives vis-à-vis de *S. aureus*, pathogène humain le plus commun colonisant un tiers des personnes en bonne santé dans le monde (Tillah *et al*., 2017). L'activité antibactérienne remarquable des résines de *P. elliottii*, *P. tropicalis* et l'acide déshydroabiétique diterpénique contre les bactéries cariogènes (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *Lactobacillus casei* et *Enterococcus faecalis*) est très prometteuse et pourrait contribuer à la découverte de nouvelles substances pouvant inhiber la croissance des micro-organismes cariogènes (da Silva *et al*., 2019).

Des extraits aqueux d'écorce de *P. pinea* et l'extrait commercial d'écorce de *P. maritima*, le Pycnogenol® confèrent une protection de la viande rouge cuite contre *Staphylococcus aureus* en diminuant considérablement son taux de croissance. Ces extraits sont utilisés comme conservateurs naturels dans l'industrie alimentaire (Hames- Kocabas *et al*., 2008). L'activité antimicrobienne est due en grande partie aux constituants des plantes (Burt, 2004).

Les polyphénols sont présents à l'état de traces dans l'aubier sain *P. radiata* (non attaqué par le champignon *Sirex*) d'âge comparable aux arbres de même espèce attaqués par *Sirex*. Les polyphénols: vanilline, acide vanillique, acide protocatéchique, acide 4-hydroxybenzoïque, acide salicylique, acide férulique, l'hydroquinone et l'éther monométhylique de pinosylvin sont formés en grandes quantités après l'infection de l'aubier par *Sirex* pour exercer ainsi leurs effets antimicrobiens (Hillis et Inoue, 1968). Ces composés (acide salicylique, vanilline, acide isoférulique, acide 4-hydroxybenzoique, acide protocatéchique) ont été retrouvés dans l'extrait aqueux de résine de pin avec pour composant majeur l'acide caféique (Haichour *et al*., 2021a). Le méthyl cis-7-oxodésisopropyldehydroabiétate et le méthyle trans-7-oxo-désisopropyldéshydroabiétate, dérivés d'acide résinique de la colophane de *P. roxburghii* inhibent complètement ou partiellement la croissance *S. aureus* et *Enterococcus faecalis*. La combinaison des deux composés inhibe en plus la croissance d'*E. coli* et de *Klebsiella pneumoniae* (Shuaib et *al*., 2013). Des composés phytochimiques tels la 7-hydroxycoumarine (dérivée de l'acide cinnamique), l'indole 3-carbinol, l'acide salicylique et la saponine ont une activité antimicrobienne contre des bactéries souvent responsables d'infections nosocomiales comme *E. coli* et *S. aureus*, sous forme de cellules planctoniques ou de biofilms. Ces composés jouent un rôle important dans l'interférence des interactions cellule-cellule et dans la formation et le contrôle du biofilm car ils affectent significativement la motilité et l'activité de détection du quorum. En outre, ces composés agissent également de manière synergique en association avec des antibiotiques tels la tétracycline, l'érythromycine, la ciprofloxacine contribuant ainsi au recyclage d'anciens antibiotiques considérés comme inefficaces en raison des problèmes de résistance (Monte *et al*., 2014).

Beaucoup d'extraits de plantes se sont révélés agir comme des inhibiteurs de QS (QSI). Les plantes ont la capacité de dégrader les molécules de signalisation produites par les bactéries, empêchent la synthèse des molécules de signalisation, ou ciblent les récepteurs ; inhibant ainsi leurs systèmes de communication et la production et l'expression des facteurs de virulence (Koh *et al*., 2013).

L'objectif du présent chapitre n'est pas de démontrer l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de résine mais plutôt mettre en évidence son pouvoir anti QS.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les souches bactériennes, *Chromobacterium violaceum* 026, *Vibrio harveyi* BB120, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et les larves d'*Artemia* provenaient du laboratoire de la faculté d'agriculture du Dr Natrah FMI, Université de Putra, Malaisie.

Chromobacterium violaceum 026 est un germe rapporteur utilisé pour mettre en évidence une caractéristique observable au laboratoire, la production de violacéine (substance toxique) dans un milieu supplémenté en N-héxanoyl homosérine lactone (HHL) à travers le QS. *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont été sélectionnés pour cette étude en raison de leurs caractères opportunistes. *Pseudomonas aeruginosa* est un Gram négatif produisant ses facteurs de virulence utilisant un système QS basé sur les AHL (autoinducteurs de type I), tandis que *Staphylococcus aureus* produit des signaux moléculaires de type autoinducteurs peptidiques responsables de la production de facteurs de virulence chez les bactéries à Gram positif. *Vibrio harveyi* BB120 étant une bactérie à Gram négatif très vulnérable vis-à-vis d'*Artemia* à cause de son système QS utilisant un autoinducteur de type II. Quant à *Artemia*, petit crustacé vivant en milieux salés, il a été utilisé pour tester la cytotoxicité de la résine de pin *in vivo* et l'effet antagoniste de cette résine envers *Vibrio harveyi* BB120 pour préserver la viabilité d'*Artemia*.

2.2. Inhibition du Quorum Sensing par EALRP

2.2.1. Défi *Artemia* (*Artemia* challenge)

Cet essai comprend deux volets, tout d'abord tester l'effet de la résine de pin quant à sa cytotoxicité vis-à-vis d'organismes vivants comme *Artemia* et ensuite tester et mettre en évidence la capacité de l'extrait de résine à protéger *Artemia* des effets mortels provoqués par la bactérie pathogène *Vibrio harveyi* BB120 par perturbation de son système QS.

Les larves d'*Artémia* stériles ont été obtenues d'après la méthode décrite par Defoirdt *et al*. (2005). Quant aux tests de protection, ils ont été effectués selon la procédure de Defoirdt *et al*. (2006).

Dans un premier temps, les cystes d'*Artemia* sont décapsulés de manière aseptique dans de l'eau de mer stérile pour faciliter leur éclosion. Les cystes décapsulés en tubes Falcon sont placés sur aérateur à lumière constante à 28°C et incubés pendant au moins 24h selon la méthode de Soto-Rodriguez *et al*. (2003) avec quelques modifications (utilisation de l'extrait végétal au lieu de microorganismes).

Dans une seconde étape, deux lots d'*Artemia* sont incubés avec de l'extrait de résine à une concentration de 12,5µg/ml. L'un des lots sert à tester la toxicité de l'EALRP contre *Artemia*, et le second pour voir si *Artemia* est protégé des effets pathogènes de *Vibrio harveyi* BB120 (10^6 cellules/ml). Le contrôle négatif est un lot témoin constitué seulement *d'Artemia* sans extrait de résine et sans bactérie pathogène. Le contrôle positif, par contre, contient *Artemia* et la bactérie pathogène mais pas d'EALRP.

Les lots sont constitués de 20 ml d'eau de mer stérile auxquels sont ajoutés 100 µl d'extrait de levure (10 g/l) et vingt *Artemia* (matures après éclosion). L'expérience est répétée deux fois avec deux répétitions.

2.2.2. Dépistage de l'activité anti QS de EALRP

L'activité anti QS de l'EALRP a été testée par la méthode de diffusion en puits décrite par McClean *et al*., (1997).

- La souche *Chromobacterium violaceum* 026 (CV026) a été cultivée dans un bouillon LB (Luria Bertani) avec 20 ppm de Kanamycine (SIGMA) pour prévenir les mutations chez CV026 et 5 ppm de N-Héxanoyl-DL-Homosérine Lactone (SIGMA) pendant 48h à une température de 32°C avec 140 rpm en aérobiose à une concentration estimée à 10^9 cellules/ml.

- 20 ml de culture de CV026 sont mélangés avec 80 ml de gélose LB semi solide (0.8%, SIGMA) et homogénéisés.

- Le mélange est versé sur une gélose solide (1.5%) pour avoir une double couche. Après solidification, des puits sont réalisés dans la couche supérieure à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

- L'extrait préparé et chacune de ses dilutions sont déposés dans les puits préparés à raison de 20 µl par puits. Le contrôle négatif est constitué d'eau et le contrôle positif est le Trans-cinnamaldéhyde (SIGMA Aldrich) à 0.1 M. Les boites de Pétri sont ensuite incubées à 32°C pendant une nuit.

- CV026 a été utilisé pour détecter et répondre à la présence de molécules HHL par synthèse d'un pigment pourpre (violacéine), l'absence de couleur pourpre indique une inhibition de la production de violacéine. Les diamètres des zones non pigmentées observées ont été mesurés.

2.2.3. Dégradation de l'HHL

Ce test a été effectué pour mettre en évidence la dégradation de l'AHL ou dégradation du QS en présence de l'EALRP selon la méthode décrite par Torres *et al*. (2013) en utilisant l'extrait de résine de pin au lieu de microorganismes.

10 ppm de HHL (8 µl / 2 ml) sont additionnés au contrôle positif ainsi qu'à la solution d'extrait de pin. Les mélanges sont ensuite filtrés à travers un filtre de 0.22 µm puis 10 µl du mélange sont déposés sur une gélose LB déjà ensemencée par 100 µl d'une culture de CV026. Dans ce cas, le temps d'incubation du mélange « EALRP +HHL » est t=0. Cette opération est répétée après 4 heures.

L'activité de dégradation de l'HHL a été observée par inhibition de la violacéine, et les diamètres des zones observées non pigmentées ont été mesurés à 0 - 4 – 24 et 72 heures après incubation à 32°C (Torres *et al*., 2013). Les dépôts des mélanges de «EALRP+HHL» aux différents intervalles de temps permettent de mettre en évidence l'effet de la résine sur l'HHL. Les temps d'incubation de la résine avec l'HHL sont de 0h, 4h, 24h et 72h.

2.3. Activité anti biofilm

L'inhibition de la formation de Biofilm est réalisée par une méthode colorimétrique au Crystal violet dans des microplaques de titration à 96 puits, selon Elhariry (2011) avec quelques modifications (les cultures bactériennes sont centrifugées pour avoir des suspensions bactériennes denses qui seront par la suite dilués en ajoutant l'extrait de résine).

Les bactéries (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphlococcus aureus*) sont cultivées pendant une nuit à 28°C dans un bouillon LB, après centrifugation les culots sont lavés deux fois par un bouillon LB double concentré et resuspendus dans 1ml de LBx2. Les bactéries sont alors distribuées à raison de 50µl/cupule. Des concentrations croissantes de l'EALRP (1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 et 50mg/ml) sont distribuées à raison de 50µl/cupule en triplicatas. La microplaque est alors incubée à 28°C sans agitation pendant une nuit.

Le jour suivant la microplaque est rincée sous le robinet, séchée à l'air, elle est colorée par une solution de Crystal violet à 0.5% pendant 10 à 20 mn. Rincée de nouveau, puis 200µl de DMSO (diméthyle sulfoxyde) sont alors rajoutés pour solubiliser le biofilm. L'absorbance est lue à 570nm dans un lecteur de microplaques (Multiskan Go, BioblockFisher).

Après lecture, les pourcentages de l'inhibition de formation de biofilm pour chaque concentration sont déterminés selon l'équation :

% (inhibition de biofilm) = [(DO témoin - DO essai) / DO témoin] x 100

2.4. Analyse statistique

Les données des tests anti QS ont subi l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) pour comparer les moyennes ± SD de 3 répétitions /dose ou plus, pour estimer les effets de l'extrait aqueux de pin sur l'inhibition des cellules/bactéries et pour éviter l'erreur. Le test est considéré comme significativement différent à $p<0.05$ pour une analyse de Tukey à comparaisons multiples. Les graphes ont été réalisés par le logiciel statistique Graph Pad Prism 8.4.2 (Graph Pad Software, USA).

3. Résultats et discussion

Dans les écosystèmes naturels, un grand nombre d'organismes coexistent. Les bactéries communiquent principalement pour coopérer entre elles et assurer une compétition avec les autres. La compétition s'opère par extinction (quenching) du système QS à travers une large gamme de composés (Kalia, 2013). La stratégie d'utilisation d'inhibiteurs de détection de quorum (QSI) peut s'avérer efficace dans la conception de nouveaux médicaments antibactériens (Romero *et al*., 2012). Tout comme les composés antiviraux qui devraient inhiber spécifiquement les fonctions virales et ne devraient pas influencer le métabolisme normal des cellules eucaryotes (Paduch *et al*., 2007), seules les molécules, qui affectent exclusivement le QS sans affecter la croissance bactérienne, sont classées comme QSI. Ainsi, contrairement aux antibiotiques, qui sont bactéricides, les QSI n'exercent pas de pression sélective (Kalia et Purohit, 2011). Les bactéries peuvent être résistantes à plusieurs antibiotiques et de nouveaux composés antimicrobiens sont alors nécessaires de toute urgence.

Dans des études menées en 2014 et publiées en 2021 (Haichour *et al*., 2021b), différentes concentrations de l'EALRP avaient été évaluées ; à 73.33mg/ml, l'extrait était faiblement actif vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus.* C'est la concentration de 275 mg/ml qui a permis d'inhiber un plus grand nombre de bactéries à savoir : *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* et *Proteus.* L'activité inhibitrice de l'EALRP vis-à-vis des Gram+ve a été plus importante vis-à-vis de *Staphylococcus,* concernant les Gram-ve l'activité la plus remarquable a été obtenue avec *Pseudomonas aeruginosa* (Noui et Laouadi, 2013). L'EALRP, avait montré une importante activité inhibitrice sur la croissance bactérienne à forte dose, où les zones d'inhibitions étaient similaires ou légèrement inférieures aux résultats obtenus avec le triméthoprime-Sulfaméthoxazole, l'ampicilline et la gentamycine (Boumaout et Djarmouni, 2014). Cette étude constitue une confirmation de l'effet synergique entre l'EALRP avec les antibiotiques contre cinq souches en particulier vis à vis de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* (zones d'inhibition de 10 à 30mm de diamètre) qui étaient résistantes à plusieurs agents antimicrobiens et antibiotiques.

3.1. Protection d'*Artemia* par l'EALRP

Les résultats enregistrés pour le défi *Artemia* ont deux aspects ; la cytotoxicité et la survie. Au temps t=0h une vingtaine d'*Artemia* étaient dénombrés dans tous les cas (figure 10) ; ce nombre a été également trouvé après 6h d'incubation, même dans le contrôle positif en présence de la bactérie pathogène *Vibrio harveyi* BB120.

La protection d'*Artemi*a contre le pathogène Gram négatif *Vibrio harveyi* BB120 met en évidence les vertus de la résine de pin. L'EALRP assure non seulement une protection totale d'*Artemia* en présence de cette bactérie virulente mais aussi il ne manifeste aucun effet toxique vis-à-vis d'*Artemia*. La virulence de *V. harveyi* BB120 envers *Artemia* est régulée par son système QS médié par l'AI-2 (Defoirdt *et al*., 2005). La résine de pin peut alors être considérée non seulement comme non cytotoxique mais aussi comme inhibiteur de QS.

De plus, *Artemia* survit en présence de la bactérie pathogène *Vibrio harveyi* BB120, donc *Artemia* a été protégé par l'EALRP contre *V. harveyi* BB120 où la viabilité était totale, et même une croissance des larves était observable. Dans d'autres travaux de Brackman *et al*. (2008), *Artemia* exposé à *V. harveyi* BB120 a montré des taux de mortalité élevés qui diminuaient significativement en présence de cinnamaldéhyde et de 2-NO_2-cinnamaldéhyde. L'artémie est également protégée *in vivo* par la furanone naturelle contre les pathogènes *V. campbellii*, *V. harveyi* et *V. parahaemolyticus* ; le système de détection de quorum est bloqué par le composé testé (Defoirdt *et al*., 2006). L'EALRP a montré un effet protecteur de l'*Artemia* aussi important que celui exercé par le contrôle positif (cinnamaldéhyde), cette protection est vraisemblablement due à sa richesse en dérivés d'acide cinnamique représentant 64.57% (Haichour *et al*., 2021a).

En revanche, la viabilité d'*Artemia* diminuait drastiquement (le taux de mortalité est de 40%) entre 6 et 24h en absence de résine, sachant qu'à 6h d'incubation la survie était totale même pour le contrôle positif. *Artemia* étant très sensible à l'infection par *Vibrio harveyi* BB120, cette bactérie provoque des taux de mortalité allant de 35 à 55% (Defoirdt *et al*., 2008).

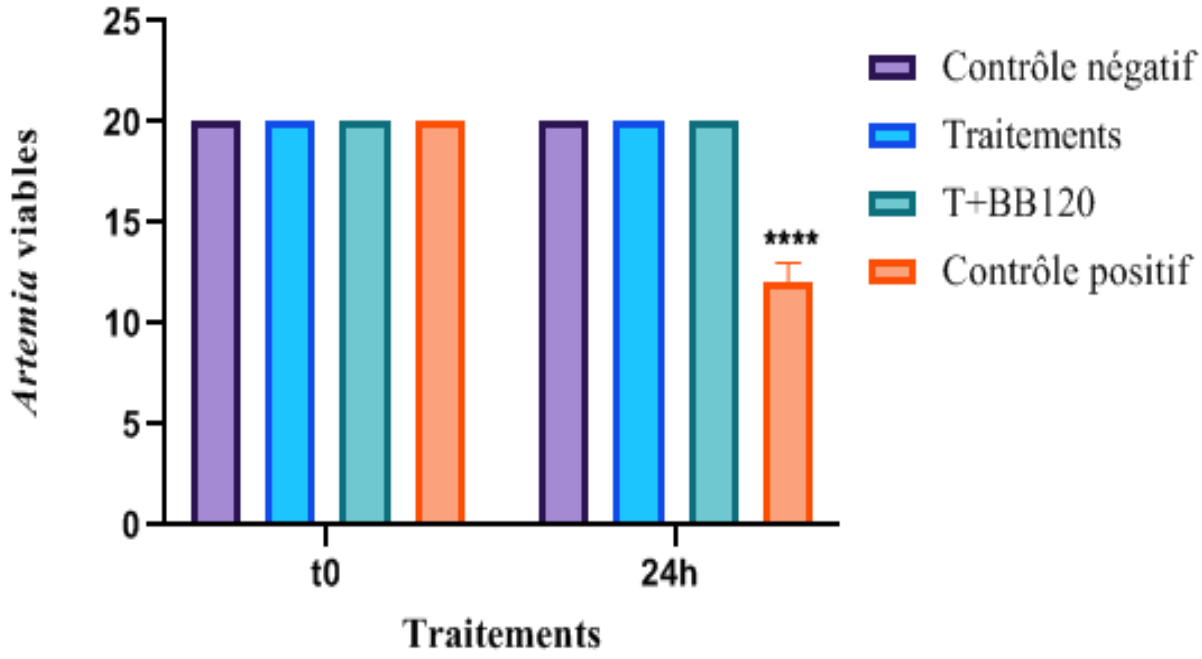


Figure 10. Test de cytotoxicité et de protection d'*Artemia* par EALRP

EALRP : Extrait Aqueux Lyophilisé de Résine de Pin ; Contrôle négatif : *Artemia* dans l'eau de mer additionnée d'extrait de levure ; T : Traitement = Contrôle négatif + EALRP ; T+BB120= Traitement +*Vibrio harveyi* BB120 ; Contrôle positif = Contrôle négatif + *Vibrio harveyi* BB120.

**** : Différences hautement significatives

3.2. Activité anti-QS de l'EALRP

Chomobacterium violaceum 026 est un mutant incapable de produire la N-hexanoyl-L-homosérine lactone (C6HSL). Un apport exogène lui permet de restaurer sa capacité à produire la violacéine provoquant la pigmentation violette par utilisation de signaux QS (McClean *et al.*, 1997 ; Koh et Tham, 2011 ; Kalia *et al.*, 2015). Les zones entourant les dépôts témoins négatifs étaient complètement violettes suite à la production de violacéine en présence d'HHL ajoutée au milieu de culture de *C. violaceum* 026. Alors qu'une absence de pigment violet entourant les extraits EALRP a été observée, ceci indique un effet inhibiteur de QS. *C. violaceum* 026 a été inhibé par l'EALRP dans un milieu supplémenté en HHL. Les zones d'inhibition de la production de violacéine ont des diamètres moyens qui variaient de 4.98 mm à 11.92 mm à 100 mg/ml (2 mg/puits), sachant qu'il y a inhibition de la production de pigment violet sans inhibition de la croissance bactérienne. La zone opaque, non transparente, observée autour des dépôts de l'extrait à tester indiquait une inhibition de la sécrétion de violacéine au lieu d'inhiber la croissance bactérienne (Tan *et al.*, 2012 ; Chenia, 2013 ; Zhou *et al.*, 2013 ; Vasavi *et al.*, 2014).

Les résultats du présent travail sont très proches de ceux de Ceylan *et al*. (2014a) ayant également utilisé un extrait aqueux lyophilisé de *Bellis perennis* à 100 mg/ml, celui-ci avait produit une zone d'inhibition pigmentaire de 10 mm contre CV 026, ou encore ceux de Vasavi *et al*. (2014) et Zhou *et al*. (2013) où la production de violacéine a été réduite de 50 % à 50 mg/ml chez *C. violaceum* 12472 (Vasavi *et al*., 2014) et 48 et 56.5% respectivement à 150 et 200 µM chez CV026 (Zhou *et al*., 2013). Mais une inhibition complète a été obtenue à 300 mg/ml. Cependant, le nombre de cellules viables ne différait pas significativement de ceux des témoins (Vasavi *et al*., 2014). On peut alors considérer que l'EALRP est un bon QSI puisque le cinnamaldéhyde utilisé comme contrôle positif (à 0.1M) a donné un diamètre d'inhibition de 13.93 mm (figure 11). Le cinnamaldéhyde est un puissant agent anti-QS (Chenia, 2013).

En diluant l'EALRP au demi dans l'eau, les zones d'inhibition de la production de violacéine ont diminué et étaient de 5.6 mm en moyenne. L'activité anti-QS, qui se traduit par une inhibition de la production de violacéine par *C. violaceum* 026 autour des dépôts de l'échantillon, est donc dépendante de la concentration de l'extrait.

Cette activité n'existait plus à 25mg/ml (extrait dilué au ¼ ; figure 11) et les zones autour des dépôts étaient toutes violettes. Comme l'EALRP, plusieurs plantes ont montré que leurs capacités anti QS étaient doses dépendantes. C'est le cas des extraits de *Melicope lunu-ankenda* vis à vis de *C. violaceum* 026 (Tan *et al*., 2012), de *Kigelia africana* vis à vis de *C. violaceum* ATCC 12472 (Chenia, 2013) et des extraits de *Psidium guajava* L (Vasavi *et al*., 2014) ou encore de l'eugénol (Zhou *et al*., 2013).

Vasavi *et al*. (2014) avaient montré que c'était la fraction FL (fraction flavonoïde) de *Psidium guajava* L. qui serait responsable de l'activité anti-QS vis à vis de *C. violaceum* 026. Un composé de nature phénolique : l'eugénol serait responsable d'une diminution significative de la production de violacéine chez *C. violaceum* 026 (Zhou *et al*., 2013). Pour Deryabin et Tolmacheva (2015) c'est la vanilline et l'alcool coniférylique, composés phénoliques de *Quercus cortex* qui seraient responsables de cette activité anti-QS prononcée chez *C. violaceum* 026.

L'EALRP pourrait être considéré comme un bon QSI en raison de sa teneur élevée en composés phénoliques où la vanilline a représenté 3.84 % (Haichour *et al*., 2021a).

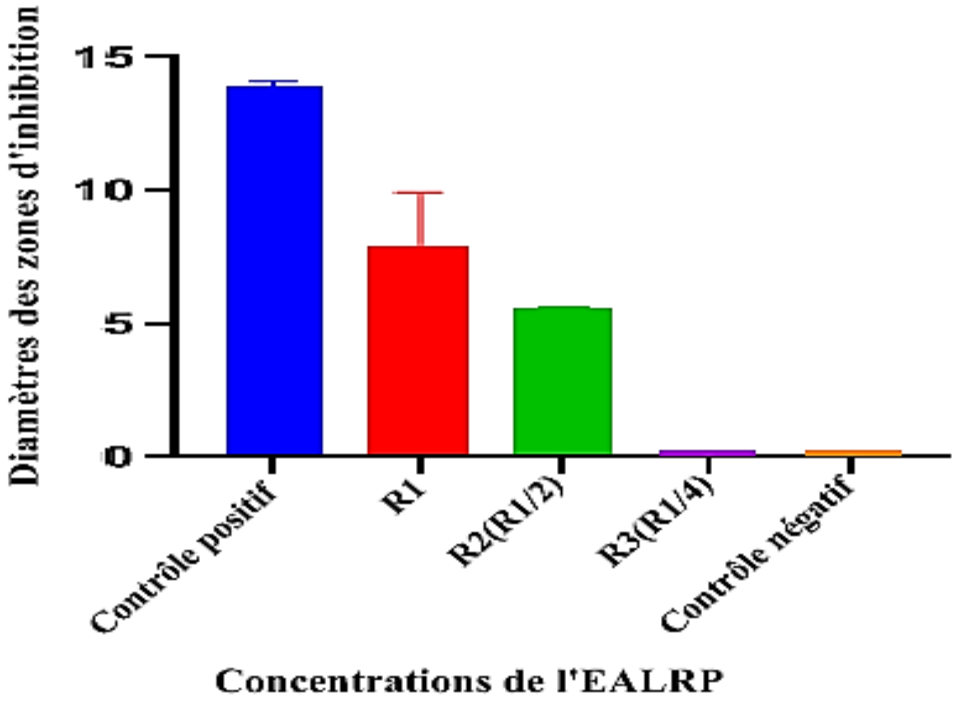


Figure 11. Activité anti QS de l'EALRP

EALRP : Extrait Aqueux Lyophilisé de Résine de Pin ; Contrôle négatif : eau ; Contrôle positif : Trans-cinnamaldéhyde à 0,1M ; R1 :100 mg résine/ml d'eau ; R2 :50 résine/ml d'eau ; R3 :25mg de résine/ml d'eau.

3.3. Dégradation de l'AHL

Les composés végétaux ciblent généralement le système QS bactérien de trois manières différentes en arrêtant la synthèse des molécules de signalisation, en dégradant les molécules de signalisation ou en ciblant le récepteur de signal (Koh *et al*., 2013).

L'addition d'AHL au milieu de culture de *C. violaceum* 026 entraîne la synthèse d'un pigment violet « violacéine », facteur de virulence chez cette bactérie.

Dans cette étude, la dégradation de l'HHL par l'EALRP a été testée en utilisant *C. violaceum* 026. Ce dernier est un mutant largement utilisé comme organisme rapporteur qui peut retrouver sa capacité à synthétiser la violacéine par un apport exogène d'HHL. (McClean *et al.*, 1997 ; Koh et Tham, 2011). Si le mélange «résine-AHL» donne des zones complètement violettes, l'HHL n'est pas dégradée par l'EALRP; l'inhibition de la synthèse de la violacéine par *C. violaceum* 026 est la conséquence de la dégradation de l'HHL.

Dans le travail présenté ici, il s'agit d'une dégradation de l'HHL car l'EALRP a été incubé avec l'HHL pendant des périodes variées allant jusqu'à 72h avant de déposer le mélange avec les bactéries (figures 12 et 13) ; tandis que le temps d'incubation avec la bactérie *C. violaceum* 026 est le même (24h à 32°C). Et plus le temps de séjour de l'HHL avec l'extrait de résine est long, plus les diamètres des zones d'inhibition de la production de violacéine sont grands (figures 9, 10). Cependant, les opinions des différents auteurs varient selon les expériences et les conditions expérimentales. Nos résultats sont en accord avec ceux de Kalia *et al*. (2015) qui ont trouvé qu'en présence d'huile de cannelle à 0.2 µl/ml, les niveaux de 3-Oxo-C12 HSL dans le surnageant de culture de *P. aeruginosa* O1 sont réduits d'environ 38 %.

Les plantes ont la capacité de dégrader les molécules de signalisation produites par les bactéries et cela va obstruer les facteurs de virulence des bactéries en perturbant leurs systèmes de communication. La résine de pin fait donc partie des plantes capables de dégrader l'AHL.

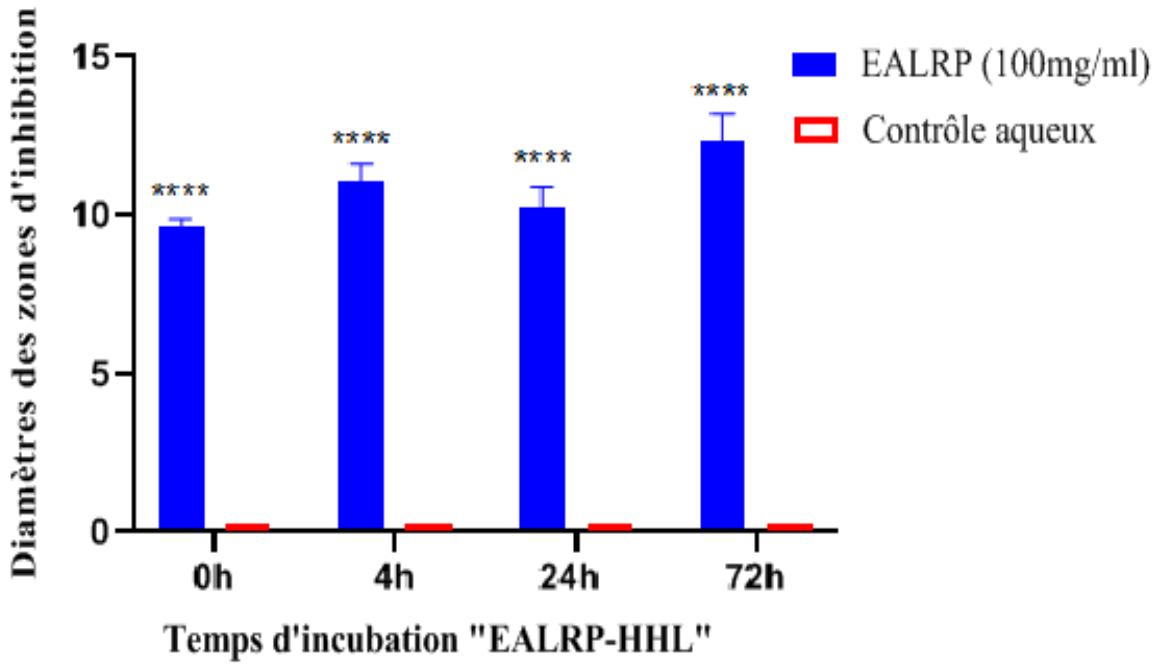


Figure 12. Dégradation de l'AHL en présence d'EALRP

Contrôle négatif : eau n'ayant donné aucun effet de dégradation de l'HHL
**** Différences hautement significatives

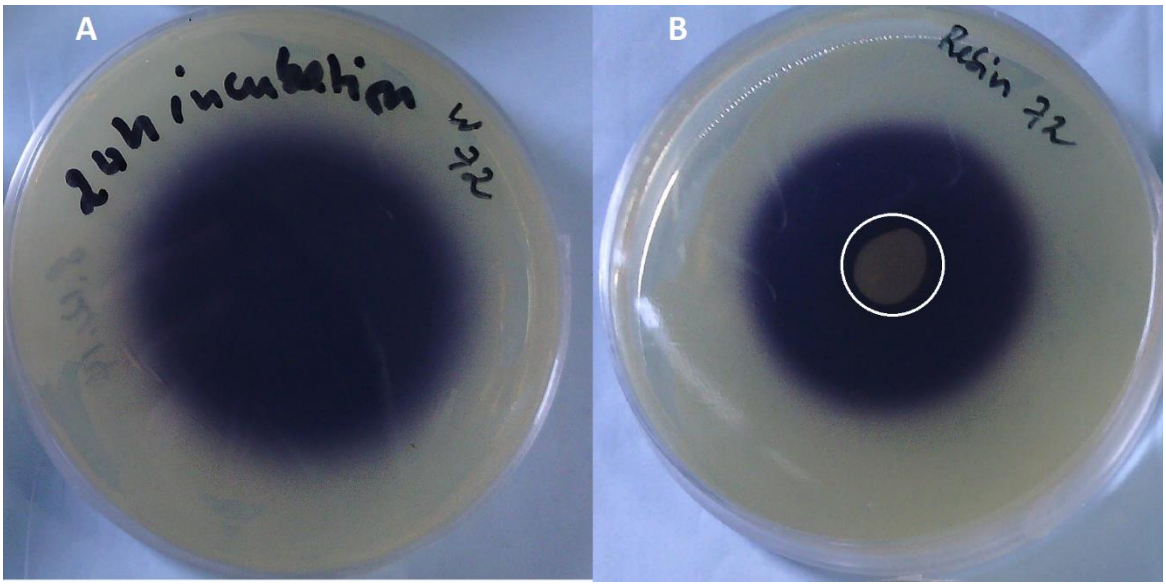


Figure 13. Dégradation de l'HHL en présence de EALRP

A : contrôle négatif= eau distillée+HHL ; B : mélange «EALRP-HHL» pendant 72h

3.4. Activité anti biofilm

Les bactéries capables de former le Biofilm seraient responsables de 80% des maladies infectieuses (Kalia et Purohit, 2011). En effet ces biofilms constituent le plus important résultat du QS bactérien (Kalia, 2013), permettant à ces bactéries de résister et fuir le système immunitaire de l'hôte (Kalia, 2013 ; Monte *et al*., 2014). Ces biofilms permettent aux bactéries de survivre aux antibiotiques (Kalia et Purohit, 2011 ; Kalia, 2013) à des doses 1000 fois plus élevées que celles qui seraient bactéricides (Kalia et Purohit, 2011). Selon les résultats, il apparaît clairement que la présence de l'EALRP a significativement inhibé la formation de biofilm par rapport au témoin non traité chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, où la concentration de 6.25mg/ml a respectivement inhibé cette formation avec 80 et 66.7% (figure 14). Malgré leurs inhibitions significatives importantes les concentrations plus élevées n'étaient pas plus efficaces.

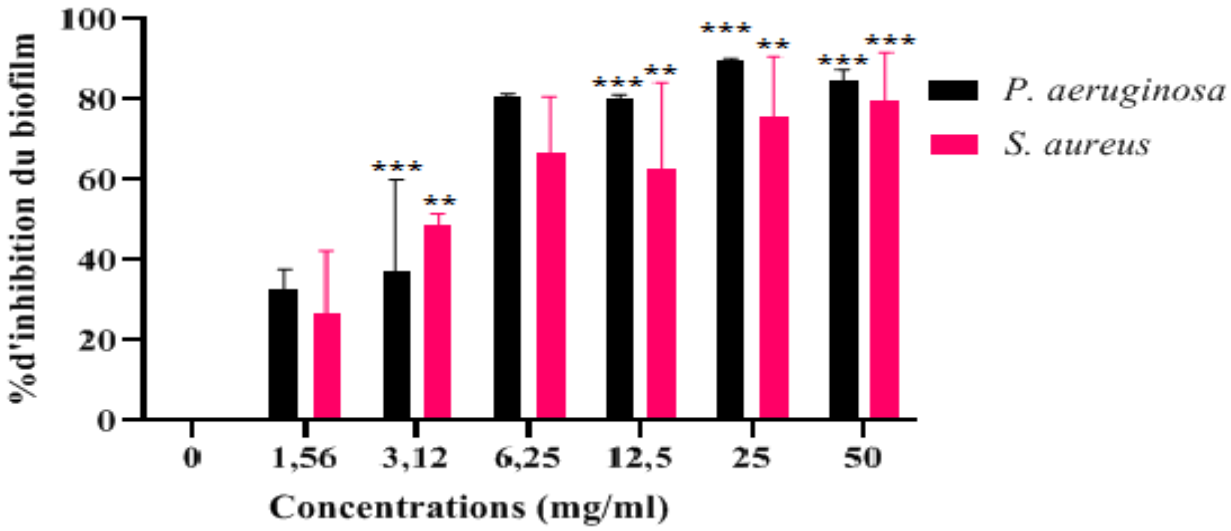


Figure 14. Pourcentages d'inhibition de formation de biofilm par *P. aeruginosa* et *S. aureus* en présence de l'EALRP
** différence significative, *** différence très significative

L'adsorption du cristal violet dans la solution de décoloration a été utilisée comme indication de la quantité de biofilm (Djordjevic et *al.*, 2002). En effet, la densité du biofilm est en relation avec l'intensité de l'anneau formé, une couleur foncée indique que les souches sont fortement productrices de biofilm et *vice versa* **(**Musk et *al*., 2005).

Alors que, l'acide salicylique inhibait jusqu'à 95% la production d'acide téichoïque, de protéines associées à la substance visqueuse et d'antigène de type 1 (Farber et Wolff, 1993). Des bactéries telluriques ont vu leurs productions d'exopolysaccharide (EPS) réduite lorsqu'elles ont été incubées avec des extraits de *Pongamia pinnata* (Kodali *et al*., 2013) de même que des souches de *Pseudomonas* en présence de 14-Alpha-lipoyl andrographolide (Zeng *et al*., 2011) . Cette réduction est en fait une activité antibiofilm (Farber et Wolff, 1993 ; Kodali *et al*., 2013).

Les extraits de *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita* et *Melaleuca alternifolia* ont montré une bonne activité antibiofilm vis à vis de deux isolats de *Listeria monocytogenes* (ATCC et clinique) avec des taux d'inhibition supérieurs à 50%. Ces extraits ont en fait inhibé l'étape initiale de la formation de biofilm (attachement cellulaire) et donc sa croissance. L'inhibition du biofilm est plus difficile à obtenir que celle de l'attachement cellulaire (Sandasi *et al*., 2010).

De nombreuses autres études ont rapporté l'inhibition de la formation de biofilms bactériens. Farber et Wolff (1993) ont évalué l'effet de l'acide salicylique sur l'adhésion d'une variété de bactéries. Ils ont observé une inhibition liée à la dose de l'acide salicylique en présence de *P. aeruginosa* et d'autres bactéries. Où l'addition de 5 mM de ce composé dans le milieu inhibe à la fois la croissance et la production de biofilm par *Staphylococcus epidermidis* jusqu'à 55%. La formation de biofilm serait inversement proportionnelle à la concentration de l'acide salicylique (Muller *et al.,* 1998). Le cinnamaldehyde et l'eugénol issus de *Cinnamomum cassia* (Niu et Gilbert, 2004) et l'acide salicylique (Monte *et al*., 2014) interfèrent avec la motilité de nage chez *E. coli* (Niu et Gilbert, 2004); ou encore de l'acide férulique qui a inhibé la motilité des bactéries pathogènes tels que *E. coli, P. aeruginosa, S. aureus* et *Listeria monocytogenes* (Borges *et al.,* 2012), la motilité de nage chez *Bacillus cereus* et *Pseudomonas fluorescens* (Borges *et al.,* 2012 ; Lemos *et al*., 2014). La 7-hydroxycoumarine a influencé les motilités d'essaimage et de nage, mais elle n'a pas été en mesure de modifier la motilité de glissement comme c'est le cas avec l'acide salicylique (Monte *et al*., 2014). L'EALRP est riche en acides aliphatiques et acides phénoliques tels que acide *p*-salicylique, la coumarine, acide 4-hydroxybenzoique et l'acide isoférulique,... L'élimination totale des biofilms n'a pas été réalisée, cependant ces dérivés peuvent être impliqués dans les changements de motilité et peuvent être associés à une capacité réduite des bactéries à former des biofilms. Ceylan *et al*. (2014a) avaient rapporté que l'extrait aqueux de *Bellis pere*nnis avait inhibé l'essaimage de 9.5% chez CV 026. Alors que dans une autre étude, utilisant l'huile essentielle de *Mentha* x *piperita*, ils ont démontré que celle-ci avait différentes proportions d'activité antibiofilm vis-à-vis de toutes les souches à Gram positif testées, *Staphylococcus epidermidis* et *S. aureus* (Ceylan *et al*., 2014b).

Activité antifongique de l'EALRP

1. Introduction

Les champignons de la peau sont associés aux troubles les plus courants chez l'homme, notamment les pellicules, la dermatite/eczéma, la teigne, le pied d'athlète, les démangeaisons et les infections des ongles (onychomycose). Ces maladies sont attribuées à deux ensembles de champignons, les dermatophytes ascomycètes, dont les genres *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton* et les champignons basidiomycètes du genre *Malassezia* (White *et al*., 2014). Les espèces de *Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton* sont les agents pathogènes les plus courants dans les infections superficielles de la peau, des cheveux et des ongles et n'infectent pas les surfaces muqueuses (Hainer, 2003 ; Khaled *et al*., 2015).

Plusieurs études ont rapporté que les plus importantes espèces fongiques incriminées dans les maladies dues aux dermatophytes en Algérie appartenaient au genre *Tricophyton*. Elles étaient prédominantes dans le Nord-Est avec un pourcentage de 66,68% dont *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton tonsurans* (Hammadi *et al.*, 2007). *Trichophyton rubrum* était le pathogène prédominant des pieds et des plis inguinaux à Sétif (Ilham et Touabti, 2013), par contre *Trichophyton mentagrophytes* était principalement responsable des teignes inflammatoires à Batna (Chelgham *et al.*, 2012). Alors qu'en 2016, Ennaghra *et al.* ont montré que les trichophytes étaient responsables de 72% des infections fongiques ; dont 24% appartenaient à l'espèce *T. rubrum* alors que 16% appartenaient à l'espèce *T. mentagrophytes*.

En plus de leurs diverses activités bénéfiques pour l'homme, les plantes présentent aussi d'importantes activités antifongiques. Des extraits aqueux, éthanolique et méthanolique d'ail (*Allium sativum*) ont des activités antidermatophytes variées comparables aux effets de la nystatine contre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton verrucosum* et *Epidermophyton floccosum* prélevés sur une soixantaine d'écoliers d'Aba au Nigéria. En effet, l'extrait aqueux inhibait le développement des dermatophytes testés avec un pourcentage allant de 50 à 90% (Venugopal et Venugopal, 1995).

Cette inhibition était significative dans le cas de *Trichophyton rubrum* (Mercy *et al.*, 2014 ; Ikegbunam *et al*., 2015) et *Trichophyton mentagrophytes* (Mercy *et al.*, 2014 ; Hailu *et al*., 2017). D'autre part, les extraits aqueux de *Capsicum chinese* et *Capsicum macrostachys* ont inhibé significativement le développement de *T. rubrum.* et de *T. mentagrophytes* respectivement (Ikegbunam *et al*., 2015 ; Hailu *et al*., 2017).

Dans leur étude ethnobotanique dédiée à la flore médicinale de djebel Zedim du nord-Est de l'Algérie, Chermat et Gharzouli (2015) ont identifié 93 espèces de plantes médicinales utilisées par les populations autochtones. Ces auteurs ont rapporté l'usage de la résine de *Pinus halepensis* Mill. comme antifongique. L'utilisation des résines de plantes par ces populations représentaient 7.19% parmi toutes les fractions de plantes utilisées (Chermat et Gharzouli, 2015).

Très peu d'études ont porté sur l'activité antifongique des extraits aqueux de *P. halepensis*, la majorité des recherches ont porté sur l'activité des huiles essentielles et des extraits alcooliques. Auparavant, Ray et Majumdar (1976) ont rapporté l'activité antifongique d'un extrait éthanolique des tiges de *P. longifolia* vis-à-vis de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida albicans*. C'est le cas de Abi-Ayad *et al*. (2011) en Algérie et Amri *et al*. (2013) en Tunisie qui avaient testé l'huile essentielle de *P. halepensis* vis-à-vis de champignons phytopathogènes respectivement *Aspergillus niger*, *A. flavus ;* et *Rhizopus stolonifer* et *Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. oxysporum, F. subglutinans, F. verticillioides, F. nygamai, Rhizoctonia* sp., *Microdochium nivale* var nivale, *Alternaria* sp., et *Bipolaris sorokiniana*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches fongiques

Les champignons dermatophytes, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton tonsurans*, proviennent du laboratoire du Dr. Jane Nicklin, School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, Université de Londres, Royaume-Uni.

2.2. Activité antifongique

L'extrait aqueux lyophilisé de la résine de *Pinus halepensis* Mill. a été testé contre les quatre champignons dermatophytes cités. Pour cela, différentes concentrations (12,5 µg/ml, 25 µg / ml, 50 µg / ml et 100 µg / ml) de l'extrait aqueux lyophilisé de résine de pin dissout dans du méthanol ont été incorporés dans le milieu de culture en surfusion (environ 48°C).

Les dermatophytes ont été cultivés sur gélose Sabouraud pendant 7 jours à 25°C (Oxoid LTD, Basing Stoke, Hampshire, Angleterre). Et des disques de 6 mm de diamètre sont alors déposés sur la gélose après solidification au centre de la boite.

Le milieu contenant la concentration appropriée de MeOH sans extrait de résine de pin est utilisé comme témoin. Les boites sont incubées à 25°C pendant 9 jours. Les taux d'inhibition de la croissance fongique sont calculés selon l'équation :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Cd-Td) / Cd)] \times 100$$

où Cd: diamètre de la colonie témoin, Td: diamètre de la colonie d'essai.

Les résultats sont convertis en probits (Finney, 1971) en fonction des $\log_2$ des concentrations afin de déterminer la CI_{50} (concentration nécessaire pour inhiber la croissance de 50%).

2.3. Analyse statistique

Les résultats de l'activité anti fongique de l'EALRP sont exprimés en moyenne ± SD. Les graphiques ont été réalisés par le logiciel statistique Graph Pad Prism 8.4.2 (Graph Pad Software, USA). La signification statistique de la différence a été évaluée par une analyse de variance à deux voies. Les différences ont été considérées comme significatives à $p<0.05$.

3. Résultats et discussion

L'utilisation d'extraits de plantes contre différents types de champignons représente une bonne alternative aux produits chimiques. L'extrait aqueux de la résine a un effet inhibiteur qui dépend de la dose et du champignon testé. A une concentration de 12.5 µg/ml l'extrait n'a aucun effet sur les deux champignons *T. rubrum* et *T. equinum*, par contre il a inhibé *T. mentagrophytes* et *T. tonsurans* avec un pourcentage de 6.67% et 7.77% respectivement. Pour les trois autres concentrations testées les pourcentages d'inhibitions augmentaient avec le temps d'incubation jusqu'au neuvième jour (figure 15).

Dans une étude de l'activité antifongique de 22 extraits aqueux de plantes (15µg.ml^{-1} de milieu) utilisés en médecine folklorique en Palestine, Ali-Shtayeh et Abu Ghdeib (1999) ont rapporté que les extraits d'*Asphodelus luteus*, *Capparis spinosa*, *Ruscus aculeatus*, *Plumbago europea*, *Inulina viscosa*, *Pistacia lentiscus* et *Juglans regia* ont inhibé la croissance de *T. mentagrophytes* de 78.3%, 83.2%, 86.3%, 88.4%, 92.8%, 94.0% et 97.6% respectivement.

A une concentration de 25 µg/ml les pourcentages d'inhibition étaient de 21.37, 14.43, 18.29 et 18.90% pour *T. equinum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* et *T. tonsurans* respectivement. A 50 µg/ml les pourcentages étaient 25.96, 27.77, 29.82 et 34.43% contre *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* et *T. equinum* respectivement. À 100 µg/ml les pourcentages d'inhibitions étaient de 58.9%; 58.44%; 41.36% et 34.43% contre *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* respectivement (figure 15). L'extrapolation des pourcentages d'inhibition en probits et en fonction du Log_2 de la concentration de l'extrait, nous a permis de conclure que la relation était linéaire et les CI_{50} étaient de 77 µg/ml et 78 µg/ml pour *T. equinum* et *T. tonsurans* respectivement. *T. tonsurans* était le plus sensible et *T. mentagrophytes* était le plus résistant. Schmourlo *et al*. (2005) ont rapporté que des extraits aqueux lyophilisés de *Xanthosomas agittifolium*, étaient très actifs contre *Trichophyton rubrum* avec une CMI de 100 ng/ml.

D'autres auteurs ont démontré que l'inhibition de nombreux dermatophytes était dose dépendante. Shams Ghahfarokhi *et al*. (2004) étudiant l'extrait aqueux d'oignon ont montré que celui-ci inhibait significativement le développement de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes*, cette inhibition évoluait dans le temps (Après 15 jours d'incubation).

En utilisant la méthode de diffusion sur gélose, Rautio *et al*. (2012) ont montré que la résine purifiée du tronc d'épinette de Norvège (*Picea abies*) a un effet inhibiteur contre *T. rubrum, T. mentagrophytes*, et *T. tonsurans.* Ces auteurs confirmèrent que la pommade avec 10 % de résine a une légère action antifongique, alors qu'avec 20 % de résine l'effet fongicide était significatif (Rautio *et al*., 2012). Le pourcentage d'inhibition était de 53.19 et 78.12% vis à vis de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes*, respectivement pour une concentration de 3.12% (v/v). Alors qu'une inhibition totale des deux dermatophytes est obtenue à une concentration supérieure à 3.12% (v/v). L'effet fongicide est observé à des concentrations allant de 6.25% à 50% (v/v) (Shams Ghahfarokhi *et al*., 2004). Deghar et Saadaoui (2015) ont montré que 10µl (à 200 mg /ml) de l'extrait lyophilisé de résine de pin déposé comme spot à la surface de la gélose suffisait pour inhiber totalement un isolat de *C. albicans* et à un degré moindre un isolat de *Cryptococcus neoformans* multirésistants à plusieurs antifongiques testés **(**Clotrimazole, Econazole, Griseoful, Itraconazole, Ketoconazole).

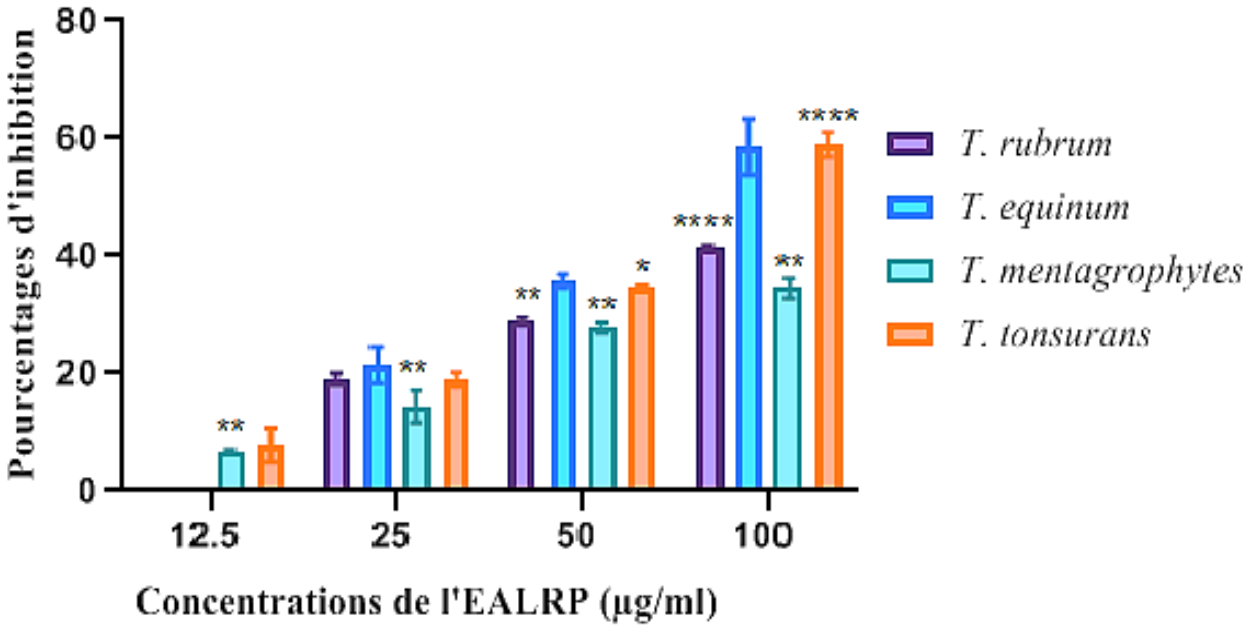


Figure 15. Pourcentages d'inhibition de croissance de champignons dermatophytes testés par l'EALRP

* différence peu significative, ** différence significative, *** différence très significative, **** différence hautement significative

L'activité antifongique de l'extrait aqueux de la résine de pin peut être liée à sa composition chimique. En fait, l'extrait aqueux de résine de pin contient des composés ayant une activité antifongique tels que l'acide vanillique (Kuete *et al*., 2010), l'acide caféique (Chong *et al*., 2011) et le thymol (Falcone *et al*., 2005 ; Guo *et al*., 2009 ; de Lira Mota *et al*., 2012 ; de Castro *et al*., 2015). En effet, l'acide vanillique a complètement inhibé la croissance de *Candida albicans* (Kuete *et al*., 2010), l'acide caféique a fortement inhibé la croissance de *Ganoderma boninense* à une concentration de 2.5 mg/ml (Chong *et al*., 2011). Le thymol s'est avéré actif *in vitro* contre 24 isolats cliniques résistants au fluconazole et 12 sensibles au fluconazole de *Candida albicans* (Guo *et al*., 2009), avec des concentrations minimum inhibitrices de 39 et 78 µg/ml pour *Candida albicans* et *C. krusei* respectivement (de Castro *et al*., 2015).

Vio-Michaelis *et al*. (2012) ont rapporté que les fractions éthanoliques d'*Ephedra breana* et de *Nolana sedifolia* contenant l'acide vanillique et l'acide caféique, ont montré un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* à une concentration de 250 µg/ml lors d'essais *in vitro*. Selon De Oliveira Pereira *et al.* (2013) l'eugénol un composé isolé de plantes aromatiques et connu pour ses activités biologiques liés à la présence du groupement phénolique, inhibant la croissance d'un isolat de *Trichophyton rubrum* très résistant aux antifongiques. Les concentrations minimales inhibitrices variaient de 64 à 512 µg/ml, où 50% des isolats testés avaient été inhibés à 256 µg/ml et 90% à une concentration de 512µg/ml. L'extrait aqueux de la résine de pin contenait des concentrations importantes de composés phénoliques qui peuvent être responsable de son activité antifongique (Haichour *et al*., 2021a).

Sipponen *et al*. (2013) dans une étude sur l'efficacité clinique d'une pommade composée de résine d'épinette de Norvège (*Picea abies*) pour le traitement des onychomycoses, ont suggéré que le traitement à long terme de résine de conifère, sous forme d'onguent à une concentration de 30%, peut avoir un effet bénéfique sur la cicatrisation de l'onychomycose. L'efficacité du traitement serait due au fait que plus de 60 % des cas dermatophytes positifs au début de l'étude devenaient négatifs à la fin de l'étude. Il y avait également une amélioration clinique chez 40% des patients et 15% des patients complètement guéris de leurs onychomycoses.

Discussion générale

La nature continue d'être une source majeure de diversité moléculaire qui, grâce à la poursuite de recherches multidisciplinaires, peut conduire à la découverte de composés phares prometteurs, dont certains pourraient être développés en médicaments importants pour la santé des communautés. La menace continue, rend urgente la nécessité d'étendre l'exploration de ces ressources en tant que source de nouveaux agents bioactifs (Cragg et Newman, 2005).

Les premiers médecins américains recommandèrent la résine de pin moulue trempée dans de l'eau, appelée eau de goudron, pour traiter de nombreux maux tels que la variole, les ulcères et la syphilis. La colophane provenant de pins tels que le pin blanc (*P. strobus*) et le pin sec (*P. rigida*) a été utilisée pour le traitement des abcès, des furoncles et des cancers. Le pin a également été utilisé pour les maux de dents et les maladies de la peau telles que le psoriasis et la teigne. Le chirurgien confédéré Francis Porter, en 1863, décrivit le pin à longues feuilles (*P. palustris*) du sud des États-Unis comme «l'un des plus grands dons de Dieu à l'homme» (Langenheim**,** 2003).

La recherche sur la séparation et la purification des produits naturels bioactifs à partir de plantes, d'animaux et de micro-organismes a attiré beaucoup d'attention dans les universités et l'industrie. La séparation est souvent un processus complexe, qui peut durer de quelques jours à plusieurs mois, selon le problème à résoudre. La séparation des produits cibles comprend deux étapes, l'extraction et la purification. Dans l'extraction, les études sont principalement axées sur l'application de solvants respectueux de l'environnement. Dans l'isolement et la purification, de nouvelles technologies de séparation telles que les techniques de chromatographie, les techniques de séparation par membrane et l'extraction à médiation par des liquides ioniques ont été développées et ont eu un impact majeur à cet égard (Ren *et al*., 2013).

L’extraction de substances antimicrobiennes des espèces végétales constitue une opération plus ou moins compliquée (Minh, 1983 ; Ren *et al*., 2013), vu leur faible teneur et leur mélange avec d’autres substances (Minh, 1983).

Il convient en tout premier lieu de contrôler leur stabilité dans des milieux à des pH différents, dans des conditions de températures et des intervalles de temps différents (Minh, 1983) leur solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques plus ou moins polaires etc… (Minh, 1983 ; Ren *et al*., 2013). Un choix doit également être fait pour le type d'extraction et le solvant utilisé. Le choix serait surtout influencé par la dégradabilité de l'extrait végétal total obtenu. L'eau semble être le meilleur solvant (Boulogne *et al*., 2012). Elle améliorerait l'efficacité de séparation des produits naturels bioactifs (Ren *et al*., 2013). Toutes les molécules à fonction hydroxyle ou glyquée sont hydrosolubles (Boulogne *et al*., 2012). Il a été montré que les extraits à l'eau chaude sont généralement plus riches en avonoïdes que les extraits à l'éthanol. En revanche, l'éthanol semble être le solvant le plus puissant pour extraire les acides cinnamiques et les proanthocyanidines (Royer *et al*., 2013).

Alors que des différences considérables dans le rendement des extraits ont été observées entre les différentes espèces de pin (*P. sylvestris, P. nigra* et *P. merkusii*), en particulier dans les extraits à l'éthanol et à l'eau. L'extrait à l'eau chaude de l'écorce est la fraction la plus importante, où la teneur en phénols semble être assez uniforme dans n'importe laquelle des espèces de pin examinées. L'analyse des écorces de *P. brutia* provenant de différents endroits et d'arbres d'âges différents ou de hauteurs diverses, la teneur en composés phénoliques des extraits aqueux était presque constante (Weissmann, 1983).

Il a été rapporté aussi que plus la solution est alcaline, plus les extraits sont récupérés. Le plus important rendement (31,30 %) d'extraction sur l'écorce de pin maritime a été obtenu avec 5 % de NaOH à 80°C. Cependant, le taux de polyphénols obtenu était le plus élevé à 1% de NaOH. Ce qui signifie qu'avec une quantité plus élevée de NaOH une quantité importante de matière non tannique est récupérée. Les arbres les plus exposés au soleil ont des concentrations de phénols plus élevées que les arbres ombragés (Chupin *et al*., 2013).

L'extrait aqueux de *Kigelia africana* présentait une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* > *E. coli* (Chauhan *et al.,* 2014). Les extraits aqueux de *Citrus limonium* se sont avérés plus efficaces que les extraits à l'éthanol et à l'acétone contre les nouvelles souches de *Bacillus licheniformis* 018 et la souche de *Bacillus licheniformis* BIHPUR 010 (Khusro *et al*., 2013).

La croissance de certains bâtonnets Gram-négatifs (*E. coli* et *P. aeruginosa*) n'est pas inhibée par la résine directement incorporée dans la gélose dans les tests de diffusion sur agar mais sont clairement sensibles lorsque la résine est en solution (Sipponen, 2013).

Les concentrations des composés de la résine sont restées stables et inchangées pendant de nombreuses années dans les pommades de résine conservées à température ambiante, voire conservées dans des conditions environnementales sévères (6 mois à 40°C). Les mêmes résultats ont été rapportés pour les baumes à base de résine faits maison utilisés pour les plaies cutanées et les infections (Sipponen, 2013). Le champ des applications traditionnelles et nouvelles des terpènes de pin est large et s'élargit (da Silva Rodrigues-Corrêa *et al*., 2012).

L'oléorésine de pin est un produit forestier non ligneux important en raison des diverses utilisations conventionnelles et potentielles de ses terpènes (da Silva Rodrigues-Corrêa *et al*., 2012). Les plantations de pinèdes sont des sources de biomasse pour l'exploration et l'extraction rationnelles continues de l'oléorésine (Da Silva Rodrigues *et al*., 2011).

L'oléorésine comprend deux fractions principales : la térébenthine, qui est la fraction volatile, et la colophane, fraction solide. La meilleure teneur de cette térébenthine a été obtenue à partir des échantillons du pin d'Alep par rapport à celle du pin maritime, soit des taux respectifs de 29% et 22%. Ces résultats confirment la richesse en pinènes de la térébenthine (Ghanmi *et al*., 2007).

Sipponen (2013), testant des échantillons de résines naturelles de conifères et d'autres extraits de bois terpéniques décrivit en permanence de l'acide coumarique (acide hydroxycinnamique), un groupe d'acides résiniques (acides hydroxyabiétique et abiétique) et un groupe de lignanes spécialement le pinorésinol. La masse totale des acides résiniques, des lignanes et de l'acide coumarique était inférieure à la moitié de la masse totale de la résine brute. Les écarts peuvent être dus au type de résine analysée (résine pathologique vs physiologique). D'autres composants que les acides résiniques, tels que les acides gras et les terpènes ou terpénoïdes non caractérisés, peuvent varier en concentration dans les résines d'origine ou de type différents.

Cependant, les concentrations d'acides résiniques, d'acide coumarique et de lignanes restent similaires et stables dans différents échantillons de résine de « cals » de conifère provenant d'épinette de plusieurs endroits en Scandinavie : Norvège, Laponie occidentale et Finlande (Sipponen, 2013). Alors que dans une étude menée au Maroc, le rendement des essences de térébenthine du Pin maritime de la Mamora, du Pin d'Alep de Rommani et Zerhoun seraient influencés par les conditions géographiques et bioclimatiques de chaque région (Ghanmi *et al*., 2005). Ceci a aussi été rapporté en Algérie, où Abi-Ayad *et al*. (2011) avaient noté des différences qualitatives et quantitatives dans la composition des huiles essentielles du pin de la région de Ghazaouet avec ceux d'origine italienne et grecque ; et ont conclu que ce serait le résultat d'un processus d'adaptation à des conditions écologiques particulières et donc déterminant pour distinguer le chémotype d'une région (Abi-Ayad *et al*., 2011). Cette différence a aussi été remarquée entre les différentes essences de pin d'une même région (Corée du sud). L'écorce de *Pinus radiata* contenait la plus forte teneur en polyphénols (55%). En effet, les composants de l'extrait à l'eau chaude étaient de 23.3% (*P. radiata*) > 14.4% (*Pinus rigida*) > 7.7% (*Pinus koraiensis*). Ces polyphénols sont plus favorablement extraits avec de l'eau où les ratios étaient constants. Par contre, les teneurs en composés phénoliques totaux et en proanthocyanidines ont indiqué des différences distinctes entre les variétés d'écorce de pin citées où, *Pinus koraiensis* a montré le contenu le plus élevé (Ku *et al*., 2007).

Le rendement en composés phénoliques d'autohydrolyse du bois de *Pinus radiata* était plus de cinq fois supérieur à ceux rapportés pour les extractions à l'éthanol ou au méthanol (Pinelo *et al*., 2004).

Le stress oxydant conduit à un déséquilibre de la balance anti-oxydant/pro-oxydant par formation de radicaux libres oxygénés comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxylé. L'action de ces radicaux libres se traduit par des dégâts oxydatifs sur les constituants cellulaires, en particulier les membranes cellulaires, ce qui entraîne la mort des cellules (Galey et Terranova, 1995).

Les composés phénoliques synthétiques conjugués aux chito oligosaccharides ont montré une importante activité antioxydante, c'est le cas de l'acide caféique conjugué qui a montré une forte activité de piégeage des radicaux hydroxyles par rapport à celles d'autres composés en raison de la présence de groupes hydroxyle (Eom *et al*., 2012).

Cuvelier *et al*. (1992) ont suggéré que la double liaison participait à la stabilisation des radicaux phénoxyle.

L'acide férulique est un constituant végétal omniprésent dans les graines et les feuilles à la fois sous sa forme libre et liée de manière covalente à la lignine et à d'autres biopolymères. En raison de son noyau phénolique et d'une conjugaison de chaîne latérale étendue, il forme facilement un radical phénoxy stabilisé qui explique son puissant potentiel antioxydant En vertu de l'élimination efficace des radicaux délétères et de la suppression des réactions oxydatives induites par les rayonnements, l'acide férulique peut remplir une fonction antioxydante importante en préservant l'intégrité physiologique des cellules exposées à la fois à l'air et au rayonnement UV (Graf, 1992).

Les extraits d'écorce de pin contiennent une série entière de procyanidines allant des monomères aux plus longs polymères (Ku *et al*., 2007). L'extrait à l'eau chaude de l'écorce de *Pinus radiata* a été fractionné en : (i) monomères polyphénoliques, trois acides phénoliques et six flavonoïdes principalement la taxifoline, les catéchines et l'acide protocatéchuique ; (ii) oligomères de proanthocyanidine allant des dimères aux hexamères ; (iii) et des polymères de proanthocyanidine comprenant de la procyanidine et une petite quantité de prodelphinidine (Ku et Mun, 2008).

Les polyphénols sous forme d'extraits d'écorce de pin sont des composants très importants car ils sont directement liés à l'estimation quantitative de l'activité antioxydante (Royer *et al*., 2013). Ils peuvent être des alternatifs aux antioxydants synthétiques plus toxiques en tant qu'additifs dans les préparations alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Ku et Mun, 2008). C'est le cas des extraits à l'eau chaude de plusieurs essences de Canada (Royer *et al*., 2013). Aux concentrations respectives de 25 mg/ml et 12.5 mg/ml, *P. radiata* *P. rigida*, et *P. koraiensis* avaient des capacités de piégeage du radical DPPH de 92.5 et 67.9%, 93.1 et 64.6% et 19.3 et 12.1% respectivement. Cette puissante activité antioxydante serait due à leur haute teneur en proanthocyanidines dans les extraits à l'eau chaude (Ku *et al*., 2007). Toutes les fractions d'écorce de *Pinus radiata* présentaient une puissante activité inhibitrice de la peroxydation lipidique. Les polymères de proanthocyanidine retardent en effet la formation d'hydroperoxyde en étouffant la voie des radicaux libres d'oxygène qui opèrent dans l'émulsion eau-huile (Ku et Mun, 2008).

D'autre part, la capacité de piégeage des radicaux DPPH des liqueurs d'autohydrolyse (Moure *et al*., 2005) ainsi que les extraits à l'eau chaude (Ku et Mun, 2008) du bois de *Pinus radiata* étaient supérieures à celles des antioxydants synthétiques (Moure *et al*., 2005 ; Ku et Mun, 2008), avec des CI50 inférieures à celles de l'hydroxyanisol butylé (Moure *et al*., 2005). L'exposition des tissus aux mélanges de proanthocyanidine devrait donc offrir une meilleure protection contre les conditions de stress oxydatif impliquant la production de ROS (Ku et Mun, 2008).

Dans le cas de l'huile essentielle d'origan, c'est la présence de thymol et de carvacrol qui seraient responsable de l'effet antioxydant (Kulisic *et al*., 2004)). Malgré sa faible activité par rapport au plus puissant antioxydant des milieux aqueux (acide ascorbique). L'huile essentielle de *Lavandula stoechas* peut être employée comme complément antioxydant vue sa liposolubilité (Mohammedi et Atik, 2012).

Les mono- et di-esters d'acide cinnamique synthétique, trouvent une application en tant que substances antioxydantes dans des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, et permettent par ailleurs de conférer des propriétés protectrices à l'égard de l'oxydation des constituants lipidiques de la peau (Galey et Terranova, 1995).

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'aiguilles de pin sur les altérations courantes et les bactéries pathogènes a montré que la croissance de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris* était inhibée de manière significative, cette activité antibactérienne peut être due à sa richesse en acides organiques (Feng *et al*., 2010).

Le combat contre les bactéries est en train de se perdre à cause des systèmes QS (QSS). Pour résoudre ce problème, les QSS doivent être interrompus à un ou plusieurs stades, ce qui pourrait par conséquent entraver le pouvoir pathogène (Kalia et Purohit, 2011). L'utilisation d'inhibiteurs du QS (QSI) peut s'avérer efficace dans la conception de nouveaux médicaments antibactériens (Romero *et al*., 2012). La présence de molécules bioactives agissant comme QSI a été détectée chez les procaryotes, les animaux et les plantes (Huma *et al*., 2011; Kalia *et al*., 2011). Les chimistes, spécialisés dans la synthèse d'analogues de QSI naturels, ont largement contribué à améliorer l'efficacité de ces molécules (Lu *et al*., 2012).

Seules les molécules qui affectent exclusivement le QS sans affecter la croissance bactérienne sont classées dans cette catégorie (Kalia et Purohit, 2011). Les QSI peuvent être utilisés pour résoudre les problèmes posés par les bactéries multirésistantes puisque le QS implique un mécanisme de régulation des gènes répondant à la présence ou à l'absence des molécules signal (Miller et Bassler, 2001).

Beaucoup d'extraits de plantes se sont révélés agir comme des inhibiteurs de QS ou QSI (Bodini *et al*., 2009 ; Koh *et al*., 2013) sans toutefois inhiber la croissance bactérienne (Brackman *et al*., 2008 ; Bodini *et al*., 2009 ; Harjai *et al*., 2014) évitant ainsi les problèmes de développement de résistances comme ceux causés par les antibiotiques (Bodini *et al*., 2009). Les plantes ont la capacité de dégrader les molécules de signalisation produites par les bactéries inhibant ainsi leurs systèmes de communication et la production et l'expression de leurs facteurs de virulence (Koh *et al*., 2013). L'écorce de chêne (*Quercus cortex*) utilisée en médecine traditionnelle depuis le Moyen Age pour traiter la diarrhée, la stomatite, la pharyngite et les inflammations cutanées exerce une importante activité anti-QS (Deryabin et Tolmacheva 2015) de même que l'ail (Bodini *et al*., 2009), se manifestant par l'inhibition de la production de violacéine (Bodini *et al*., 2009 ; Deryabin et Tolmacheva 2015).

Chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, l'activité anti QS de canneberge se traduit par une réduction significative de la formation de biofilm et d'autres facteurs de virulence tels le taux d'alginate, l'hydrophobicité à la surface des cellules, la pyochéline, l'hémolysine et la phospholipase-C (Harjai *et al*., 2014). Alors que l'huile essentielle de cannelle réduirait son essaimage, sa production de pyocyanine et aussi sa production d'alginate (Kalia *et al*., 2015). Ce caractère QSI est dépendant de certaines molécules présentes dans ces extraits. Bien que l'acide *p*- coumarique soit un précurseur du signal cumaroyl–AHL, les productions dépendantes du QS seraient fortement inhibées par l'acide *p*-coumarique c'est le cas de l'acide phénazine-1-carboxylique par *Pseudomonas chlororaphis*, la β-galactosidase par *Agrobacterium tumefaciens* et de la violacéine par *Chromobacterium violaceum* (Bodini *et al*., 2009). La production de violacéine est également inhibée par la vanilline et le 2-méthoxyphénol benzènediol, l'alcool conifériyle structurellement similaire à l'eugénol (Deryabin et Tolmacheva 2015), la 7-hydroxycoumarine et l'acide salicylique (Monte *et al*., 2014). D'autres part, le 14-Alpha-lipoyl andrographolide, dérivé de *Andrographis paniculata* a altéré l'expression des gènes *las* et *rhl* régulant le QS chez *P. aeruginosa* (Zeng *et al*., 2011).

D'autres facteurs de virulences seraient sensibles à certaines molécules. Le cinnamaldéhyde et ses dérivés comme le 2-NO_2-cinnamaldéhyde interfèrent avec le QS basé sur AI-2 chez diverses espèces de *Vibrio* et entraînent plusieurs changements phénotypiques notamment la diminution de l'activité de la protéase ou encore de la production et/ou l'accumulation de la matrice d'exopolysaccharide du biofilm chez *Vibrio anguillarum*. Une virulence réduite, une sensibilité accrue au stress et la bioluminescence est aussi inhibée chez *Vibrio harveyi* BB170 (Brackman *et al*., 2008). L'activité du cinnamaldéhyde et du 2-NO_2-cinnamaldéhyde a aussi permis la protection d'*Artemia* contre l'agent mortel *Vibrio harveyi* BB120 agissant *via* son système QS (Brackman *et al*., 2008).

En procédant à l'analyse des substances antibactériennes d'origine végétale, il a été observé que très peu possédaient une forte activité. Dans la pratique thérapeutique populaire, on emploie rarement une seule plante pour traiter une maladie, mais on préfère associer plusieurs plantes, chacune d'elles apportant sa contribution, soit directe, soit indirecte, dans l'élaboration d'une action synergique optima. Et c'est là peut-être la raison qui explique pourquoi les substances antibactériennes d'origine végétale suscitent rarement le phénomène de résistance **(**Minh, 1983).

La plupart du temps, les extraits naturels doivent leur activité biologique à la synergie entre leurs différents composés (Poppenga, 2001). Le mélange de ces composés montre un large spectre d'effets biologiques et pharmacologiques. Il convient de noter que les HE sont des mélanges hétérogènes de substances uniques, leurs principales actions biologiques sont dues aux composants dans un concert très compliqué d'activités synergiques ou antagonistes (Lahlou, 2004). C'est le cas des composés de l'huile essentielle d'origan (Kulisic *et al*., 2004) ou de térébenthine de pin maritime de la Mamora et de pin d'Alep de Rommani, le spectre d'activité de l'HE totale est parfois plus grand que ceux de leurs principaux constituants testés isolément (Pattnaik *et al*., 1997).

En effet, le mélange l'EALRP et de propolis lyophilisée a exercé un effet inhibiteur plus grand que les effets séparés de la résine et de la propolis. L'augmentation de cette sensibilité des souches vis-à-vis des extraits mélangés peut être liée à une addition d'effets des divers composants de chaque extrait. D'autre part, l'addition d'EALRP aux disques d'antibiotiques a révélé une augmentation de l'effet inhibiteur chez toutes les souches testées (Boumaout et Djarmouni, 2014).

De plus, la combinaison d'antibiotiques tels que l'azithromycine, la ciprofloxacine, la fosfomycine, la streptomycine et la gentamicine avec le 14-Alpha-lipoyl andrographolide a montré une activité synergique des activités antibiofilm et antivirulence (Zeng *et al*., 2011).

En plus de leurs activités antibactériennes, les extraits de plantes ont aussi été utilisés contre les agresseurs d'origine fongique. Divers extraits et fractions de feuilles de *Aegle marmelos* ont montré une activité antifongique significative contre divers isolats cliniques de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum, Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* et *Epidermophyton floccosum* (Balakumar *et al*., 2011). Les extraits de feuilles de *Pinus wallichiana*, ont des activités antifongiques contre *Microsporum canis* avec une concentration minimale inhibitrice de 25µg/ml (Taj Ur Rahman *et al*., 2016). Alors que, l'extrait aqueux de résine de *Araucaria columnaris* a réduit jusqu'à 95% la croissance de phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporyum, Rhizoctonia* sp., *Cylindrocladium* sp., *Alternaria* sp. et *Colletrotricum* sp. (Saranya *et al*., 2014). Même à la plus faible concentration d'extrait aqueux de *Hydnora abyssinica*, 10 mg/ml, tous les isolats fongiques ont montré une inhibition substantielle de leur croissance comme *T. rubrum* et *C. albicans* (Saadabi et Ayoub, 2009). Cette activité peut affecter aussi bien la croissance et la sporulation, comme c'est le cas de *Microsporum gypseum* inhibé par *Phyllanthus amarus* (Agrawal *et al*., 2004), que la germination des spores de *Candida albicans, Epidermophyton floccosum, Microsporum audouinii*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton rubrum* par l'huile essentielle du clou de girofle (Chee et Lee, 2007).

Testant l'activité antidermatophyte de 305 extraits provenant de 61 plantes médicinales appartenant à 33 différentes familles de la région de Hyderabad Karnataka vis-à-vis de *Trichophyton rubrum* (2015a) et *Trichophyton tonsurans* (2015b), Singh et Vidyasagar ont montré que certaines plantes étaient actives contre les deux champignons testés. C'est le cas de *Allium sativam* L., *Annona squamosa* L., *Corchorus oleterius* L., *Gymnosporia montana* (Roth) Benth et *Zingiber officinale* Roscoe.

Les écorces d'arbres de *P. pinaster* L., *Casuarina equisetifolia* L., *Acacia mollissima* L., *P. brutia* Ten. et *Abies nordmanniana* sont très efficaces contre le champignon de la pourriture brune du bois, *Coniophera puteana* et le champignon de la pourriture blanche du bois, *Trametes versicolor* (Özgenç *et al*., 2017). En effet, les huiles essentielles des pins sont aussi hautement actives contre divers champignons. C'est le cas de l'huile essentiellle de *P. heldreichii* qui est active contre *C. albicans* 10231, *C. tropicalis* 13801 et *C. glabrata* 28838 (Graikou *et al*., 2012). Ou encore celle de *P. halepensis* contre *Fusarium avenaceum, F. culmorum, , F. subglutinans, F. verticillioides, F. nygamai, Rhizoctonia* sp., *Microdochium nivale* var nivale, *Alternaria* sp., *Bipolaris sorokiniana* (Amri *et al*., 2013), *F. oxysporum* (Abi-Ayad *et al*., 2011 ; Amri *et al*., 2013), *Aspergillus niger, A. flavus,* et *Rhizopus stolonifer* (Abi-Ayad *et al*., 2011), et celle de *P. roxburghii* possédant aussi des effets antifongiques contre *Aspergillus terus, A. flavus* et *Trichoderma viridae* (Mir *et al*., 2018).

De nombreuses études ont rapporté que la teneur élevée en composés phénoliques pourrait être responsable de cette activité antifongique (Özgenç *et al*., 2017). De même que certains terpènes comme le cembrène (Graikou *et al*., 2012). Ces extraits peuvent être utilisés comme agents de conservation du bois (Özgenç *et al*., 2017).

Les huiles essentielles de *Lavandula stoechas* sont des antifongiques naturels très efficaces , il serait intéressant d'envisager l'utilisation de cette huile pour protéger les silos de céréales contre une dégradation par les champignons contaminants au cours de leur conservation (Mohammedi et Atik, 2012).

De nombreux médicaments utiles sur le plan clinique tirent leur origine de diverses plantes. Ceux-ci incluent la vinblastine et la vincristine (Mahidol *et al*., 1998 ; Girl *et al*., 2009) alcaloïdes (Girl *et al*., 2009) de *Catharanthiis roseus* et l'étoposide, un semi-synthétique. Le taxol (ou paclitaxel, un diterpénoïde) a été isolé de l'écorce de *Taxus brevifolia*. La découverte du taxol a en effet suscité l'intérêt pour les médicaments anticancéreux à base de plantes (Mahidol *et al*., 1998). De même que la vinblastine et la vincristine présentent un intérêt particulier en raison de leur utilisation mondiale dans la chimiothérapie anticancéreuse (Girl *et al*., 2009).

Des activités antivirales ont été aussi démontrées chez les pins. Un extrait à l'eau chaude de cônes de *Pinus yunnanensis* (YNS-PY-F) a des activités antivirales significatives contre différentes souches de VIH (VIH-1IIIB, VIH-1RF, VIH-1A17, VIH-1AO18 et VIH-2ROD). L'extrait de YNS-PY-F inhibe puissamment la fusion entre les cellules C8166 normales et les cellules H9 infectées de manière chronique par HIV-1IIIB ce qui suggère que YNS-PY-F peut inhiber l'entrée du VIH dans les cellules. YNS-PY-F inhibait également de manière significative l'activité de la transcriptase inverse du VIH-1 (Zhang *et al*., 2012). De plus, l'huile de *Pinus roxburghii* possède une activité anticancéreuse *in vitro* contre le cancer de Breast (T47D, MCF), le cancer du côlon (TH-1), le gliome (C6), le cancer du poumon A549 (Mir *et al*., 2018). L'extrait méthanolique de bois du pin rouge présente non seulement une activité anticancéreuse très intéressante mais aussi il est plus toxique envers les cellules cancéreuses qu'envers les cellules saines (Simard, 2007).

En outre, les terpénoïdes constituent un groupe intéressant d'agents naturels dotés d'activités antivirales à la fois spécifiques et étendues qui pourraient être utilisés pour améliorer l'efficacité thérapeutique du traitement antiviral standard. Les phytocomposés peuvent être considérés comme des antiviraux efficaces puisque les composés antiviraux devraient inhiber spécifiquement les fonctions virales sans influencer le métabolisme normal des cellules eucaryotes (Paduch *et al*., 2007).

Des concentrations non cytotoxiques des composés phénoliques comme les acides caféique et cinnamique ont des actions antivirales en inhibant la réplication du poliovirus de type 1 dans les cellules HEp-2 (Búfalo *et al*., 2010). Des résultats prometteurs ont été obtenus lors d'une autre étude portant sur l'activité antivirale de L'EALRP contre CVB4 (coxsackie virus B4), répliqué sur une lignée de cellules pulmonaires humaines (cellules Hep-2). En effet, l'EALRP s'est montré protecteur contre les infections causées par CVB4 (coxsackie virus B4) dont la multiplication est inhibée dans les cellules Hep-2 avec une CI_{50} de 4 mg/ml, cette dose étant non cytotoxique puisque les cellules Hep-2 étaient complètement viables en présence de l'EALRP à des concentrations allant jusqu'à 1.56 mg/ml et la CC_{50} (concentration cytotoxique 50) n'était exprimée qu'à 12.5 mg/ml (Haichour *et al*., 2021b).

Dans la même étude nous avons testé l'activité antivirale de L'EALRP contre la réplication d'EBV (virus Epstein-Barr) sur une lignée de cellules lymphocytaires (P3HR-1). Notre extrait n'a pas d'activité antivirale puisqu'il n'y a pas eu d'inhibition de la réplication de l'EBV. Cependant, l'expression de l'antigène de capside virale était significative. Ceci permet une prévention contre l'effet prolifératif de l'EVB. Jones *et al*. (2017) suggèrent que la capacité des agents thérapeutiques à induire une infection lytique par l'EBV peut être une importante modalité pour prévenir ou traiter des tumeurs malignes positives à l'EBV.

L'application de la résine de conifères aux patients présentant des plaies chirurgicales chroniques compliquées n'a aucun événement indésirable ni réaction allergique. La résine de conifère et la pommade à base de résine n'ont aucune propriété mutagène en utilisant des souches de *Salmonella typhimurium* (Sipponen, 2013).

La plupart du temps, les extraits naturels doivent leur activité biologique à la synergie entre leurs différents composés, car leur activité est moindre que lorsque ces substances sont ensemble. On considère également que la toxicité des extraits est plus élevée si les substances sont purifiées alors qu'elle est réduite en considérant le pool de composés. Ce phénomène est connu sous le nom de buffering (Gould, 1996).

Conclusion et Perspectives

Utilisées dans la médication traditionnelle, les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs exerçant une thérapie douce, généralement, sans effets secondaires.

La caractérisation des composés hydrophiles de la résine de pin ainsi que l'évaluation de ses activités antioxydante et antimicrobiennes démontrées dans ce travail mettent en évidence l'efficacité médicinale de ce produit forestier et présentent un appui pour son utilisation traditionnelle par la population Algérienne depuis la nuit des temps.

Les capacités antioxydante et antimicrobienne globales des extraits végétaux sont généralement liées à leurs compositions chimiques et aussi à la structure de ces composants. L'EALRP ne reflète alors que partiellement les vertus de la résine de *Pinus halepensis* Mill. puisqu'il n'y a pas de méthode d'extraction standard capable d'extraire tous les éléments bénéfiques d'une plante qui pourraient agir en synergie même s'ils ne présentent que des fractions mineures dans une plante. Par conséquent d'autres composés présents et qui ne sont pas extraits par la méthode adoptée ne font que renforcer les bienfaits de la résine de *Pinus halepensis* Mill.

Le potentiel assez important de piégeage du DPPH et le degré de blanchiment du β-carotène de l'EALRP mis en évidence, indiquent que cet extrait est doté d'une activité antiradicalaire remarquable et que les mécanismes d'action antioxydante de cette résine pourraient avoir une corrélation avec l'incidence de certaines maladies comme le cancer, les maladies cardiaques, le diabète et d'autres maladies liées au vieillissement. L'EALRP peut être utilisé comme stratégie de prévention et de lutte contre les effets biologiques néfastes des radicaux libres.

En outre, l'EALRP grâce à sa teneur en antioxydants pourrait être efficace pour préserver divers aliments, produits cosmétiques, parapharmaceutiques,… contre les effets oxydatifs délétères et la perte de la valeur commerciale et nutritionnelle.

L'extrait aqueux lyophilisé de résine de *P. halepensis* Mill., ayant subi *in vivo* des tests de cytotoxicité vis-à-vis d'*Artemia*, n'a montré aucun effet cytotoxique. En outre, l'EALRP s'est montré comme un puissant protecteur des larves d'*Artemia* en présence d'une bactérie virulente, agissant *via* un mécanisme de pathogénicité QS-dépendant, *Vibrio harveyi* BB120.

L'EALRP s'est présenté dans cette étude comme un anti QS très efficace. Il a montré sa capacité d'inhibition de la production d'un facteur de virulence chez *C. violaceum* 026, la "violacéine" par un mécanisme dégradant l'HHL. D'autres facteurs de virulence utilisant l'AHL peuvent également être inhibés par cet extrait bien qu'il n'ait exercé son pouvoir bactéricide qu'à des concentrations très élevées dans des études antérieures, ce qui évite la sélection de bactéries résistantes. De plus, la croissance bactérienne n'est pas inhibée à des concentrations de résine présentant des effets anti-QS. Cette propriété ne fait que nous rassurer en utilisant la résine de pin pour traiter ou atténuer les infections bactériennes surtout avec l'augmentation alarmante de leur résistance aux antibiotiques.

La formation de biofilm est l'un des aspects majeurs contrôlés par le quorum sensing renforçant ainsi la dissémination des infections causées par des germes pathogènes et opportunistes tels *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. En effet, l'EALRP a montré sa capacité d'inhibition de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* malgré la haute concentration exigée pour exercer un effet inhibiteur de croissance bactérienne.

Par conséquent, l'utilisation de l'EALRP pourrait présenter une stratégie pour entraver les systèmes QS avant que la communication bactérienne ne commence et que les bactéries ne sachent qu'elles ont atteint le seuil de densité de population nécessaire pour établir une infection dans le corps humain.

Le test antifongique réalisé avec l'EALRP a montré un effet antifongique considérable *in vitro* vis-à-vis de dermatophytes redoutables appartenant au genre *Trichophyton*. L'activité antifongique naturelle de l'extrait aqueux testé peut être une solution alternative quant à la multirésistance aux antifongiques des champignons pathogènes.

Les composés phénoliques de l'EALRP pourraient être à l'origine de ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Il serait intéressant d'effectuer des séparations et des analyses qualitatives et quantitatives des principaux composés phénoliques de la résine de *P. halepensis* Mill. et localiser les principes actifs de différents extraits.

La résine de pin, traditionnellement connue pour ces propriétés médicinales et utilisée pour protéger l'homme de différentes maladies, peut jouer alors le rôle d'antioxydant, antifongique et aussi comme inhibiteurs du QS.

L'utilisation des plantes en tant que nouvelles sources d'antioxydants et d'antimicrobiens pour améliorer la santé de l'être humain et son mode de vie est d'un intérêt crucial. Il serait donc intéressant, à l'essor de la présente étude, de mener des études plus approfondies et de comprendre le rapport entre les activités (antioxydante, anti QS et antifongique) et les composés de la résine de pin en plus d'autres études par concertation des efforts de la communauté scientifique.

Les forêts et produits forestiers restent des ressources, naturelles et renouvelables, les plus importantes et les plus précieuses ! Nous devons alors poursuivre nos efforts de protection et de valorisation de notre patrimoine naturel.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de criblage ont contribué à confirmer l'expérience séculaire de nos ancêtres dans l'utilisation des plantes médicinales pour traiter les maladies infectieuses.

Références bibliographiques

Abbou, A., Kadri, N., Debbache, N., Dairi, S., Remini, H., Dahmoune, F., Berkani, F., Adel, K., Belbahi, A., & Madani, K. (2019). Effect of precipitation solvent on some biological activities of polysaccharides from *Pinus halepensis* Mill. seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *141*, 663–670. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.266

Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F. Z., Lazzouni, H. A., Rebiahi, S. A., Ziani-Cherif, C., & Bessiere. (2011). Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plant Research*, *5*(22), 5433–5436.

Agrawal, A., Srivastava, S., Srivastava, J. N., & Srivasava, M. M. (2004). Evaluation of inhibitory effect of the plant *Phyllanthus amarus* against dermatophytic fungi *Microsporum gypseum*. *Biomedical and Environmental Sciences*, *17*(3), 359–365.

Ahmad, I., Mehmood, Z., & Mohammad, F. (1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, *62*(2), 183–193. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00055-5

Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(2), 143–152. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002

Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. H., & Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *179*(12), 3928–3935. https://doi.org/10.1128/jb.179.12.3928-3935.1997

Alfredsen, G., Solheim, H., & Slimestad, R. (2008). Antifungal effect of bark extracts from some European tree species. *European Journal of Forest Research*, *127*(5), 387–393. https://doi.org/10.1007/s10342-008-0222-x

Ali-Shtayeh, M. S., & Abu Ghdeib, S. I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, *42*(11–12), 665–672. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00499.x

Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Gargouri, S., Fezzani, T., & Jamoussi, B. (2013). Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological Agriculture and Horticulture*, *29*(2), 91–106. https://doi.org/10.1080/01448765.2013.764486

Balakumar, S., Rajan, S., Thirunalasundari, T., & Jeeva, S. (2011). Antifungal activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) leaf extract on dermatophytes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *1*(4), 309–312. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60049-X

Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Thien, H. V., & Khedher, M. (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: Mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique*, *69*(4), 393–403. https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589

Benarba, B., Belabid, L., Righi, K., Bekkar, A. A., Elouissi, M., Khaldi, A., & Hamimed, A. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, *175*, 626-637. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.030

Benderradji, L., Rebbas, K., Ghadbane, M., Bounar, R., Brini, F., & Bouzerzour, H. (2014). Ethnobotanical study of medicinal plants in djebel Messaad region (M'Sila, Algeria). *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, *3*(12), 445–459.

Bensaid, S., Hamimi, S., & Tabti, W. (1998). La question du reboisement en Algérie. *Sécheresse*, *9*(1), 5–11.

Bhatia, A. L., & Manish, J. (2009). Plants with antioxidative properties in radioprotection with reference to *Amaranthus* and *Spinacia*. In (Trivedi, P. C.), *Medicinal Plants, Utilisation and Conservation*. (2nd Revised and Enlarged Edition, chap. 18, pp. 342-390). Jaipur-302 004, India.

Bodini, S. F., Manfredini, S., Epp, M., Valentini, S., & Santori, F. (2009). Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and *p*-coumaric acid. *Letters in Applied Microbiology*, *49*(5), 551–555. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02704.x

Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2008). agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathogens*, *4*(4), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000052

Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in Microbiology*, *19*(9), 449–455. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.06.004

Borges, A., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*, *28*(7), 755–767. https://doi.org/10.1080/08927014.2012.706751

Bouasla, A., & Bouasla, I. (2017). Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytomedicine*, *36*, 68–81. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.007

Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp.*Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*, *9*(6), 14–19.

Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., & Loranger-Merciris, G. (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, *10*(4), 325–347. https://doi.org/10.1007/s10311-012-0359-1

Boumaout, D., & Djarmouni, Y. (2014). *Etude de la synergie, extraits végétaux et antibiotiques, contre les bactéries.* Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algérie.

Brackman, G., Defoirdt, T., Miyamoto, C., Bossier, P., Van Calenbergh, S., Nelis, H., & Coenye, T. (2008). Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiology*, *8*, 1–14. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-149

Búfalo, M. C., Candeias, J. M. G., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., & Sforcin, J. M. (2010). *In vitro* cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEp-2 cells. *Natural Product Research*, *24*(18), 1710–1718. https://doi.org/10.1080/14786410902909300

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223–253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Ceylan, O., Ugur, A., Sarac, N., & Kocman, A. (2014a). *In vitro* antimicrobial, antioxidant, antibiofilm and quorum sensing inhibitory activities of *Bellis perennis* L. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 35–42.

Ceylan, O., Ugur, A., Sarac, N., & Sahin, M. D. (2014b). The antimicrobial and antibiofilm activities of *Mentha* x *piperita* L . essential oil. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 23–27.

Chauhan, P. K., Singh, V., Sharma, S., & Pandey, I. P. (2014). Phytochemical, Antioxidant and *in vitro* Antibacterial Activity of Aqueous and Ethanolic Fruit Extracts of *Kigelia Africana*. *Universities' Journal of Phytochemistry and Ayurvedic Heights*, *2*(17), 45–49.

Chee, H. Y., & Lee, M. H. (2007). Antifungal activity of clove essential oil and its volatile vapour against dermatophytic fungi. *Mycobiology*, *35*(4), 241. https://doi.org/10.4489/myco.2007.35.4.241

Chelgham, I., Belkhelfa, S., Achachi, S., Aissaoui, I., & Mohamdi, N. (2012). Teignes du cuir chevelu : cas diagnostiques au laboratoire de parasitologie-mycologie CHU Batna : période 2002—2011. *Journal de Mycologie Médicale*, *22*(1), 112–113. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.12.045

Chen, C.-N., Weng, M.-S., Wu, C.-L., & Lin, J.-K. (2004). Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwanese propolis from different sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *1*(2), 175–185. https://doi.org/10.1093/ecam/neh034

Chenia, H. Y. (2013). Anti-quorum sensing potential of crude *Kigelia africana* fruit extracts. *Sensors (Switzerland)*, *13*(3), 2802–2817. https://doi.org/10.3390/s130302802

Chermat, S., & Gharzouli, R. (2015). Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria - An empirical knowledge in Djebel Zdimm (Setif). *Journal of Materials Science and Engineering A*, *5*(2), 50–59. https://doi.org/10.17265/2161-6213/2015.1-2.007

Chohra, D., & Ferchichi, L. (2019). Ethnobotanical study of Belezma National Park (BNP) plants in Batna: East of Algeria. *Acta Scientifica Naturalis*, *6*(2), 40–54. https://doi.org/10.2478/asn-2019-0017

Choi, Y., Park, H., Park, S. J., Park, S., Kim, S., Ha, C., Im, S., & Lee, J. (2011). Growth phase-differential quorum sensing regulation of anthranilate metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules and Cells*, 57–65. https://doi.org/10.1007/s10059-011-2322-6

Chong, K. P., Rossal, S., & Atong, M. (2011). HPC fingerprints and in vitro antimicrobial activity of syringic acid, caffeic acid, and 4-hydroxybenzoic acid against *Ganoderma boninense*. *Journal of Applied Sciences*, *11*(13), 2284–2291. https://doi.org/10.3923/jas.2011.2284.2291

Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., Argenio, D. D., Manoil, C., & Greenberg, E. P. (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*, *98*(5). https://doi.org/10.1073/pnas.051624298

Chugani, S., & Greenberg, E. P. (2010). LuxR homolog-independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*, *107*(23), 10673–10678. https://doi.org/10.1073/pnas.1005909107

Chupin, L., Motillon, C., Charrier-El Bouhtoury, F., Pizzi, A., & Charrier, B. (2013). Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC. *Industrial Crops and Products*, *49*, 897–903. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.045

Ciesla, W. (1998). Non-Wood Products From Conifers. In *Non Wood Forest Products*. FAO, Technical papers, (Vol. 12, pp. 124).

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). International collaboration in drug discovery and development from natural sources. *Pure and Applied Chemistry*, *77*(11), 1923–1942. https://doi.org/10.1351/pac200577111923

Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *56*(2), 324–325. https://doi.org/10.1271/bbb.56.324

da Silva Rodrigues, K. C., Apel, M. A., Henriques, A. T., & Fett-Neto, A. G. (2011). Efficient oleoresin biomass production in pines using low cost metal containing stimulant paste. *Biomass and Bioenergy*, *35*(10), 4442–4448. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.08.021

da Silva Rodrigues-Corrêa, K. C., de Lima, J. C., & Fett-Neto, A. G. (2012). Pine oleoresin: Tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees. *Food and Energy Security*, *1*(2), 81–93. https://doi.org/10.1002/fes3.13

da Silva, K. R., Damasceno, J. L., Inácio, M. de O., Abrão, F., Ferreira, N. H., Tavares, D. C., Ambrosio, S. R., Veneziani, R. C. S., & Martins, C. H. G. (2019). Antibacterial and cytotoxic activities of *Pinus tropicalis* and *Pinus elliottii* resins and of the diterpene dehydroabietic acid against bacteria that cause dental caries. *Frontiers in Microbiology*, *10*(5), 1–9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00987

de Castro, R. D., de Souza, T. M. P. A., Bezerra, L. M. D., Ferreira, G. L. S., de Brito Costa, E. M. M., & Cavalcanti, A. L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: An *in vitro* study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s12906-015-0947-2

de Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, *68*(9), 4839–4849. https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4839-4849.2000.Updated

de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *181*(7), 2175–2184.

De Lira Mota, K. S., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W. A., Lima, I. O., & De Oliveira Lima, E. (2012). Antifungal activity of *Thymus vulgaris* l. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with ergosterol. *Molecules*, *17*(12), 14418–14433. https://doi.org/10.3390/molecules171214418

De Oliveira Pereira, F., Mendes, J. M., & De Oliveira Lima, E. (2013). Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Medical Mycology*, *51*(5), 507–513. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.742966

Debazac, E.-F., & Tomassone, R. (1965). Contribution à une étude comparée des Pins méditerranéens de la section *halepensis*. *Annales Des Sciences Forestières*, *22*(2), 213–256. https://doi.org/10.1051/forest/19650201

Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2005). The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology*, *7*(8), 1239–1247. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00807.x

Defoirdt, T., Crab, R., Wood, T. K., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2006). Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(9), 6419–6423. https://doi.org/10.1128/AEM.00753-06

Defoirdt, T., Verstraete, W., & Bossier, P. (2008). Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(5), 1480–1487. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03672.x

Deghar, A. & Saadaoui, N. (2015). *Activité biologique d'un extrait végétal vis-à-vis de trois levures*. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algérie.

Dell, B., & McComb, A. J. (1979). Plant resins—their formation, secretion and possible functions. *Advances in Botanical Research*, *6*(C), 277–316. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60332-8

Delmond, B. (2002). Résines naturelles. *Techniques de l'Ingénieur*, *33*(k340), 1–14.

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

Deryabin, D. G., & Tolmacheva, A. A. (2015). Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract. *Molecules*, *20*(9), 17093–17108. https://doi.org/10.3390/molecules200917093

Dietrich, L. E. P., Price-whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., & Newman, D. K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, *61*(5), 1308–1321. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x

Diggle, S. P., Cornelis, P., Williams, P., & Cámara, M. (2006). 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Old molecules, new perspectives. *International Journal of Medical Microbiology*, *296*(2–3), 83–91. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.038

Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(6), 2950–2958. https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002

El Omari, N., Fatima Ezzahrae, G., El Menyiy, N., Benali, T., Aanniz, T., Chamkhi, I., Balahbib, A., Taha, D., Shariati, M. A., Zengin, G., El-Shazly, M., & Bouyahya, A. (2021). Phytochemical and biological activities of *Pinus halepensis* Mill., and their ethnomedicinal use. *Journal of Ethnopharmacology*, *268*, 113661. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113661

Elhariry, H. M. (2011). Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: Cabbage and lettuce. *Food Microbiology*, *28*(7), 1266–1274. https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.05.004

Ennaghra, N., Meddour, A., Soumati, B., & Kabouchi-Bouzidi, L. (2016). Epidemiological survey on the dermatophyte flora in the area of Annaba East of Algeria. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, *6*(12), 8–15. https://www.textroad.com/JAEBS-December, 2016.html

Eom, T. K., Senevirathne, M., & Kim, S. K. (2012). Synthesis of phenolic acid conjugated chitooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *34*(2), 519–527. https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.004

Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2005). A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *Journal of Food Protection*, *68*(8), 1664–1670. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.8.1664

Farber, B. F., & Wolff, A. G. (1993). Salicylic acid prevents the adherence of bacteria and yeast to silastic catheters. *Journal of Biomedical Materials Research*, *27*(5), 599–602. https://doi.org/10.1002/jbm.820270506

Feng, S., Zeng, W., Luo, F., Zhao, J., Yang, Z., & Sun, Q. (2010). Antibacterial activity of organic acids in aqueous extracts from pine needles (*Pinus massoniana* Lamb.). *Food Science and Biotechnology*, *19*(1), 35–41. https://doi.org/10.1007/s10068-010-0005-2

Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, *10*(2), 248–253. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80147-6

Finney, D.J. (1971). *Probit analysis*. 3rd Edition, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 333 pp.

Fuqua, C., Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, *35*, 439–468. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913

Galey, J.-B., Terranova, E., (1995). *Mono-et di-esters d'acide cinnamique ou de l'un de ses dérivés et de vitamine C, leur procédé de préparation et leur utilisation comme anti-oxydants dans des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires.* European Patent Office, Publication Number: 0 664 290 A1.

Ganin H., Yardeni E.H., and Kolodkin-Gal I. (2015). Biofilms: maintenance, development, and disassembly of bacterial communities are determined by QS cascades. In Kalia, V. C. (Ed.), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. (Springer, pp. 23-37). Delhi, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8

García-Pérez, M. E., Royer, M., Duque-Fernandez, A., Diouf, P. N., Stevanovic, T., & Pouliot, R. (2010). Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, *132*(1), 251–258. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.08.030

Ghanmi, M., El Abid, A., Chaouch, A., Aafi, A., Aberchane, M., El Alami, A., & Farah, A. (2005). Étude du rendement et de la composition de l'essence de térébenthine du Maroc: Cas du Pin maritime (*Pinus pinaster*) et du Pin d'Alep (*Pinus halepensis*). *Acta Botanica Gallica*, *152*(1), 3–10. https://doi.org/10.1080/12538078.2005.10515450

Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch, A., Aafi, A., Abid, A. El, Ismaili, M. R., & Farah, A. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (Pinus hale- pensis) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, *154*(2), 293–300. https://doi.org/10.1080/12538078.2007.10516058

Ghedira, K., & Goetz, P. (2011). *Pinus sylvestris* L. (*Pinaceae*) : Pin sylvestre. *Phytotherapie*, *9*(6), 373–375. https://doi.org/10.1007/s10298-011-0675-9

Gifford, E. M., & Foster, S. A. (1989). Division coniferophyta. In Freeman, W. H. (Ed.), *Vascular plants* (3ème éd., pp. 626).

Girl, C. C., Girl, A., & Narasu, M. L. (2009). *Catharanthus roseus* (periwinckle) : A potential drug source for cancer chemotherapy and biotechnological interventions. In P. C. Trivedi (Ed.), *Medicinal Plants, Utilisation and Conservation* (2nd Revised and Enlarged Edition, pp. 475–504).

Gould, G. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection, supp*, 82–86.

Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, *13*, 435–448.

Graikou, K., Gortzi, O., Mantanis, G., & Chinou, I. (2012). Chemical composition and biological activity of the essential oil from the wood of *Pinus heldreichii* Christ. var. *leucodermis*. *European Journal of Wood and Wood Products*, *70*(5), 615–620. https://doi.org/10.1007/s00107-012-0596-9

Gras, A., Serrasolses, G., Vallès, J., & Garnatje, T. (2019). Traditional knowledge in semi-rural close to industrial areas: Ethnobotanical studies in western Gironès (Catalonia, Iberian Peninsula). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *15*(1), 1–37. https://doi.org/10.1186/s13002-019-0295-2

Groleau, M., De Oliveira Pereira, T., Valérie, D., & Déziel, E. (2020). PqsE Is essential for RhlR-dependent quorum sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biology and Physiology, MSystems*, *5*(3), 1–13. https://doi.org/doi:10.1128/msystems.00194-20

Gülçin, Ji., Elmastat, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2007). Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. Family *Lamiaceae*) Assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, *21*, 354–361. https://doi.org/10.1002/ptr.2069

Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., Xiang, H., Deng, X., & Yu, L. (2009). Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, *58*(8), 1074–1079. https://doi.org/10.1099/jmm.0.008052-0

Haichour, Nora, Mezaache-aichour, S., Soltani, E., Kada, S., Martínez, J. R., Esteban, M. A., Nicklin, J., & Zerroug, M. M. (2021a). Lyophilized aqueous extract of *Pinus halepensis* (Mill.) resin : chemical composition , antioxidant and antidermatophytic activities. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1–6. https://doi.org/https://doi.org/10.15414/jmbfs.3423

Haichour, N., Mezaache-Aichour, S., Khenchouche, A., Melouli, H., Natrah, F. M. I., & Zerroug, M. M. (2021b). Antiviral , antibacterial and anti-quorum sensing activities of a lyophilized aqueous pine resin extract. *Phytothérapie*, 1–12. https://doi.org/10.3166/phyto-2021-0283

Hailu, G. (2017). In vitro antifungal activity of Croton macrostachys and Allium sativum extracts against *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes* isolates. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, *5*(3), 42–47.

Hainer, B. L. (2003). Dermatophyte infections. *Pratical Therapeutics*, *67*(1), 101–108.

Hames- Kocabas, E. E., YesiL-ÇeliKtas, Ö., Isleten, M., & Sukan, F. V. (2008). Antimicrobial activity of pine bark extract and assessment of potential application in cooked red meat. *GIDA*, *33*(3), 123–127.

Hammadi, K., Selselet, A. g, & Bensoltane, S. A. (2007). Dermatophytes in North West of Algeria a prospective study. *Middle-East Journal of Scientific Research*, *2*(3–4), 104–106.

Harjai, K., Gupta, R. K., & Sehgal, H. (2014). Attenuation of quorum sensing controlled virulence of *Pseudomonas aeruginosa* by cranberry. *Indian Journal of Medical Research*, *139*(3), 446–453.

Hillis, W. E., & Inoue, T. (1968). The formation of polyphenols in trees -IV. The polyphenols formed in *Pinus radiata* after *Sirex* attack. *Phytochemistry*, *7*(1), 13–22. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88199-6

Huma, N., Shankar, P., Kushwah, J., Bhushan, A., Joshi, J., Mukherjee, T., Raju, S. C., Purohit, H. J., & Kalia, V. C. (2011). Diversity and polymorphism in AHL-Lactonase gene (aiiA) of *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(10), 1001–1011. https://doi.org/10.4014/jmb.1105.05056

Iconomou, N., Valkanas, G., & Buchi, J. (1964). Composition of gum turpentines of *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* grown in Greece. *Journal of Chromatography*, *16*, 29–33. https://doi.org/doi:10.1016/s0021-9673(01)82437-7

Ikegbunam, M., Ukamaka, M., & Emmanuel, O. (2016). Evaluation of the antifungal activity of aqueous and alcoholic extracts of six spices. *American Journal of Plant Sciences*, *07*(01), 118–125. https://doi.org/10.4236/ajps.2016.71013

Ilham, A., & Touabti, A. (2011). Les onychomycoses au laboratoire de parasitologie CHU Sétif : étude sur dix ans. *Journal de Mycologie Médicale*, *23*(1), 81–82. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.12.036

Ivanova K., Fernandes M.M., & Tzanov T. (2015). Strategies for silencing bacterial communication. In Kalia, V. C. (Ed.), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. (Springer, pp. 197-216). Delhi, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8

Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., & Yao, K. (2019). Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases. *BioMed Research International*, *2019*, 1–16. https://doi.org/10.1155/2019/2015978

Jones, R. J., Iempridee, T., Wang, X., Lee, H. C., Mertz, J. E., Kenney, S. C., Lin, H. C., Baladandayuthapani, V., Christopher, W., Shah, J. J., Weber, D. M., & Orlowski, R. Z. (2017). Lenalidomide, thalidomide, and pomalidomide reactivate the Epstein-Barr virus lytic cycle through phosphoinositide 3-kinase signaling and ikaros expression. *Clinical Cancer Research*, *22*(19), 4901–4912. https://doi.org/doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2242

Kalia, C. V., Raju, S. C., & Purohit, H. J. (2011). Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and lactonase. *The Open Microbiology Journal*, *3*(1), 1–13. https://doi.org/10.2174/1874285801105010001

Kalia, M., Yadav, V. K., Singh, P. K., Sharma, D., Pandey, H., Narvi, S. S., & Agarwal, V. (2015). Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, *10*(8), 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135495

Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, *31*(2), 224–245. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004

Kalia, V. C. (2015). Microbes: The Most Friendly Beings. In Kalia, V. C. (Ed.), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight* (Springer, pp. 1–5). https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8

Kalia, V. C., & Purohit, H. J. (2011). Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets. *Critical Reviews in Microbiology*, *37*(2), 121–140. https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.532479

Karepova, Z. A., . Repyakh, S. M., & Levdikova, V. L. (1983). Acids of an aqueous extract of the woody verdure of the pine *Pinus sylvestris*. *Chemistry of Natural Compounds*, *19*(3), 362–363. https://doi.org/doi:10.1007/bf00579780

Kaur, R., & Malik, C. P. (2014). *Cissus quadrangularis* L - Its botany, chemistry and medicinal importance: A review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *6*(1), 27–35.

Khaled, J. M., Golah, H. A., Khalel, A. S., Alharbi, N. S., & Mothana, R. A. (2015). Dermatophyte and non dermatophyte fungi in Riyadh City, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(5), 604–609. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.006

Khusro, A., Preetamraj, J. P., & Panicker, S. G. (2013). A comparative analysis of antibacterial activity of *Citrus limonium* juice extracts, antibiotics and commercially available citric acid against new strains of bacteria for the prevention of eye infections. *International Journal of Advanced Research*, *1*(9), 104–111. http://www.journalijar.com/uploads/2013-11-30_141128_136.pdf

Koch, B., Liljefors, T., Persson, T., Nielsen, J., Kjelleberg, S., & Givskov, M. (2005). The LuxR receptor : the sites of interaction with quorum-sensing signals and inhibitors. *Microbiology*, *151*(11), 3589–3602. https://doi.org/10.1099/mic.0.27954-0

Kodali, V. P., Karlapudi, A. P., Kotam, M., Kota, R. K., Punati, T., & Byri, R. B. (2013). Plant extracts as antibiofilm agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *21*(1), 325–328.

Koh, C.-L., Sam, C.-K., Yin, W.-F., Tan, L. Y., Krishnan, T., Chong, Y. M., & Chan, K.-G. (2013). Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors (Switzerland)*, *13*(5), 6217–6228. https://doi.org/10.3390/s130506217

Koh, K. H., & Tham, F. Y. (2011). Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *44*(2), 144–148. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2009.10.001

Kostylev, M., Kim, D. Y., Smalley, N. E., Salukhe, I., & Greenberg, E. P. (2019). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum- sensing hierarchy. *PNAS*, 1–6. https://doi.org/10.1073/pnas.1819796116

Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I. P., Simporé, J., & Nikiéma, J. B. (2009). Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J . F . Gmel (*Combretaca*). *Sciences et Techniques*, *32*(1-2), 9–23.

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, *89*(3), 217–233. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008

Ku, C. S., & Mun, S. P. (2008). Stabilization of extracellular matrix by *Pinus radiata* bark extracts with different molecular weight distribution against enzymatic degradation and radicals. *Wood Science and Technology*, *42*(5), 427–436. https://doi.org/10.1007/s00226-008-0182-9

Ku, C. S., Jang, J. P., & Mun, S. P. (2007). Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *Journal of Wood Science*, *53*(6), 524–528. https://doi.org/10.1007/s10086-007-0896-6

Kuete, V., Poumale, H. M. P., Guedem, A. N., Shiono, Y., Randrianasolo, R., & Ngadjui, B. T. (2010). Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (*Euphorbiaceae*). *South African Journal of Botany*, *76*(3), 536–542. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.003

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, *85*(4), 633–640. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024

Kumar, P. (2009). "Green Healers": A Review. In (Trivedi P. C.), *Medicinal Plants, Utilisation and Conservation*. (2nd Revised and Enlarged Edition, chap. 6, pp. 95-103). Jaipur-302 004, India.

Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, *18*(6), 435–448. https://doi.org/10.1002/ptr.1465

Langenheim, J. H. (2003). *Plant resins: Chemistry, evolution, ecology, ethnobotany*. (Timber Press, Portland, Cambridge, Oregon 97204, U.S.A. pp.586).

Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, *6*(1), 26–41. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x

Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., & Zhang, L. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Journal of Bacteriology*, *march*, 1–7.

Lemos, M., Borges, A., Teodósio, J., Araújo, P., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. (2014). The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *86*, 42–51. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.011

Lequette, Y., Lee, J., Ledgham, F., Lazdunski, A., & Greenberg, E. P. (2006). A Distinct QscR Regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Circuit. *Journal of Bacteriology*, *188*(9), 3365–3370. https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3365

Lintz, M. J., Oinuma, K., Wysoczynski, C. L., Greenberg, P. E., & Churchill, M. E. A. (2011). Crystal structure of QscR , a *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal receptor. *PNAS*, *108*(38), 15763–15768. https://doi.org/10.1073/pnas.1112398108

Longmore, B. (2007). Anthogenol – The secret of OPCs is out there. *Australian Pharmacist*, *26*(10), 787–792.

Lopez, V. (2011). Are traditional medicinal plants and ethnobotany still valuable approaches in pharmaceutical research? *Boletin Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, *10*(1), 3–10.

Lu, C., Kirsch, B., Zimmer, C., De Jong, J. C., Henn, C., Maurer, C. K., Müsken, M., Häussler, S., Steinbach, A., & Hartmann, R. W. (2012). Discovery of antagonists of PqsR, a key player in 2-alkyl-4-quinolone- dependent quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa. *Chemistry and Biology*, *19*(3), 381–390. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.01.015

Mahidol, C., Ruchirawat, S., Prawat, H., Pisutjaroenpong, S., Engprasert, S., Chumsri, P., Tengchaisri, T., Sirisinha, S., & Picha, P. (1998). Biodiversity and natural product drug discovery. *Pure and Applied Chemistry*, *70*(11), 2065–2072. https://doi.org/10.1351/pac199870112065

Malik, C. P., Garg, P., Singh, Y., & Grover, S. (2012). Medicinal uses, chemical constituents and micro propagation of three potential medicinal plants. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, *2*(3), 57–76.

Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., Ghadraoui, L., Guedira, A., & Aafi, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Juniperus communis* du Maroc. *Bulletin de La Société Royale Des Sciences de Liège*, *80*, 791–805. https://popups.uliege.be:443/0037-9565/index.php?id=3340

Masquelier, J. (1987). *Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof* (Patent No. 4698360). https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=US37678335

McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, *143*(12), 3703–3711. https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703

McKnight, S. L., Iglewski, B. H., & Pesci, E. C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *182*(10), 2702–2708. https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2702-2708.2000

Meddour, R., & Meddour-Sahar, O. (2015). Medicinal plants and their traditional uses in Kabylia (Algeria): an ethnobotanical survey. *Planta Medica*, *77*(12). https://doi.org/10.1055/s-0031-1282417

Menale, B., & Muoio, R. (2014). Use of medicinal plants in the South-Eastern area of the Partenio Regional Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, *153*(1), 297–307. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.039

Mercier, B., Prost, J., & Prost, M. (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α- and β-pinenes): A review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, *22*(4), 331–342. https://doi.org/10.2478/v10001-009-0032-5

Mercy, K. A., Ijeoma, I., & Emmanuel, K. J. (2014). Anti-dermatophytic activity of garlic (*Allium sativum*) extracts on some dermatophytic fungi. *International Letters of Natural Sciences*, *24*, 34–40. https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilns.24.34

Miara, M. D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M. A., & Maggi, F. (2019). Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, *16*(March 2017), 100262. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100262

Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, *55*(4), 165–199. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165

Minh, N. D. (1983). Des plantes médicinales à propriétés antimicrobiennes. *La Revue Française Traditionnelle Chinoise*, *100*, 303–312.

Mion, S., Remy, B., Plener, L., Chabrière, É., & Daudé, D. (2019). Quorum sensing et quorum quenching : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ? *Medecines/Sciences*, *35*, 31–38. doi:10.1051/medsci/2018310

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

Mohammedi, Z., & Atik, F. (2012). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Nature & Technologie*, 34–39.

Monnet, V., & Gardan, R. (2015). Quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: "cherchez le peptide". *Molecular Microbiology*, *97*(2), 181–184. https://doi.org/10.1111/mmi.13060

Monte, J., Abreu, A. C., Borges, A., Simões, L. C., & Simões, M. (2014). Antimicrobial activity of selected phytochemicals against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and their biofilms. *Pathogens*, *3*(2), 473–498. https://doi.org/10.3390/pathogens3020473

Mortier, F. (n.d.). Preparation des extraits destinés a l'évaluation pharmacologique. *Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, Université de Nancy I, 54000 NANCY (France)*, 1–6.

Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Antioxidant activity of liquors from aqueous treatments of *Pinus radiata* wood. *Wood Science and Technology*, *39*(2), 129–139. https://doi.org/10.1007/s00226-004-0279-8

Moussaid, M., Elamrani, A. aziz, Berahal, C., Moussaid, H., Bourhime, N., & Benaissa, M. (2011). Evaluation of the antioxidant potential of some Morocco medicinal plants. *Global Journal of Pharmacology*, *5*(3), 153–158. http://www.idosi.org/gjp/5(3)11/7.pdf

Mukherjee T. (2009). Medicinal plants: need for protection. In Trivedi, P. C. (Ed.), *Medicinal Plants, Utilisation and Conservation*. (2nd Revised and Enlarged Edition, chap. 19, pp. 391-404). Jaipur-302 004, India.

Muller, E., Al-Attar, J., Wolff, A. G., & Farber, B. F. (1998). Mechanism of salicylate-mediated inhibition of biofilm in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Infectious Diseases*, *177*(2), 501–503. https://doi.org/10.1086/517386

Musk, D. J., Banko, D. A., & Hergenrother, P. J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry and Biology*, *12*(7), 789–796. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.05.007

Nahal, I. (1962). Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) Etude taxonomique, phytogéographique écologique et sylvicole. *Annales de l'École Nationale Des Eaux et Forêts et de La Station de Recherches et Expériences, tome xix*(fascicule 4), 1–220.

Nazim, B., Houari, T., & Benhaddou, I. (2020). Ethnobotanical survey of some plants used in Tessala region, Algeria. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants (CUPMAP)*, *3*(1), 18–24. https://doi.org/10.38093/cupmap.652708

Neacsu, M., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., Pietarinen, S. P., Ahotupa, M. O., Holmbom, B. R., & Willför, S. M. (2007). Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *Holz Als Roh - Und Werkstoff*, *65*(1), 1–6. https://doi.org/10.1007/s00107-006-0121-0

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, *70*(3), 461–477. https://doi.org/10.1021/np068054v

Niu, C., & Gilbert, E. S. (2004). Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 6951–6956. https://doi.org/10.1128/aem.70.12.6951-6956.2004

Noui, R., & Laouadi, I. (2013). *Activité antimicrobienne d'extraits lyophilisés de résine naturelle*. Mémoire de Master, Université Ferhat Abbas, Sétif 1, Algérie.

Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, *48*(6), 1429–1449. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x

Ouelbani, R., Bensari, S., Mouas, T. N., & Khelifi, D. (2016). Ethnobotanical investigations on plants used in folk medicine in the regions of Constantine and Mila (North-East of Algeria). *Journal of Ethnopharmacology*, *194*, 196–218. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.016

Ouhaddou, H., Boubaker, H., Msanda, F., & El Mousadik, A. (2015). An ethnobotanical study of medicinal plants of the Agadir Ida Ou Tanane province (South-West Morocco). *Journal of Applied Biosciences*, *84*(1), 7707. https://doi.org/10.4314/jab.v84i1.5

Özgenç, Ö., Durmaz, S., Yıldız, Ü. C., & Erişir, E. (2017). A Comparison between some wood bark extracts: antifungal activity. *Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty*, *17*(3), 502–508. https://doi.org/10.17475/kastorman.282637

Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: Substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *55*(5), 315–327. https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1

Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(5), 1871–1881. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w

Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M. & Kole, C.R. (1997) Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89, 39-46.

Pearson, J. P., Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of Bacteriology*, *181*(4), 1203–1210. https://doi.org/10.1128/jb.181.4.1203-1210.1999

Periasamy, S., Joo, H., Duong, A. C., Bach, T. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y. C., & Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* bio films develop their characteristic structure. *PNAS*, *109*(4), 1281–1286. https://doi.org/10.1073/pnas.1115006109

Pesci, E. C., Pearson, J. P., & Seed, P. C. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *179*(10), 3127–3132. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02338-z

Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, *85*(2), 267–273. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.020

Platt, T., & Fuqua, C. (2010). What's in a name? The semantics of quorum sensing. *Trends of Microbiology*, *18*(9), 383–387. https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.05.003.What

Podbielski, A., & Kreikemeyer, B. (2004). Cell density - Dependent regulation: Basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *International Journal of Infectious Diseases*, *8*(2), 81–95. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.04.003

Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Génie Industriel*, *4*(16), 26–39.

Poppenga, R. H. (2001). Risks associated with the use of herbs and other dietary supplements. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, *17*(3), 455–477. https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30045-7

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4290–4302. https://doi.org/10.1021/jf0502698

Que, F., Mao, L., & Pan, X. (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, *39*(5), 581–587. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.12.001

Quézel, P. (1986). Les pins du groupe "*halepensis*", écologie, végetation, écophysiologie. *Le Pin d' Alep et Le Pin Brutia Dans La Sylviculture Méditerranéenne. (Options Méditerranéennes: Série Etudes; n. 1986-I)*, *23*, 11–23. http://scholar.google.gr/scholar?q=quezel+Les+pins+du+groupe+%22Halepensis%22&btnG=&hl=en&as_sdt=0%2C5#0

Quézel, P., & Barbero, M. (1992). Le pin d'Alep et les espèces voisines : répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. *Forêt Méditerranéenne*, *XIII*(3), pp 158-170.

Rai, N., Rai, R., & Venkatesh, K. V. (2015). Quorum sensing biosensors. In Kalia, V. C. (Ed.), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight.* (Springer, pp. 173–183). https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8

Rashid, S., Ahmad, M., Zafar, M., Sultana, S., Ayub, M., Khan, M. A., & Yaseen, G. (2015). Ethnobotanical survey of medicinally important shrubs and trees of Himalayan region of Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, *166*, 340–351. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.042

Rautio, M., Sipponen, A., Lohi, J., Lounatmaa, K., Koukila-Kähkölä, P., & Laitinen, K. (2012). *In vitro* fungistatic effects of natural coniferous resin from Norway spruce (*Picea abies*). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *31*(8), 1783–1789. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1502-9

Ray, P. G., & Majumdar, S. K. (1976). Antimicrobial activity of some Indian plants. *Economic Botany*, *30*(4), 317–320. https://doi.org/doi:10.1007/bf02904653

Reading, N. C., & Sperandio, V. (2005). Quorum sensing: The many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *254*(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x

Rebbas, K., Bounar, R., Gharzouli, R., Ramdani, M., Djellouli, Y., & Alatou, D. (2012). Plantes d'intérêt médicinal et écologique dans la région d'Ouanougha (M'Sila, Algérie). *Phytotherapie*, *10*(2), 131–142. https://doi.org/10.1007/s10298-012-0701-6

Reguieg, L. (2011). Using medicinal plants in Algeria. *American Journal of Food and Nutrition*, *1*(3), 126–127. https://doi.org/10.5251/ajfn.2011.1.3.126.127

Ren, Q., Xing, H., Bao, Z., Su, B., Yang, Q., Yang, Y., & Zhang, Z. (2013). Recent advances in separation of bioactive natural products. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *21*(9), 937–952. https://doi.org/10.1016/S1004-9541(13)60560-1

Romero, M., Acuna, L., & Otero, A. (2012). Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. *Recent Patents on Biotechnology*, *6*(1), 2–12. https://doi.org/10.2174/187220812799789208

Royer, M., Prado, M., García-Pérez, M. E., Diouf, P. N., & Stevanovic, T. (2013). Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *PharmaNutrition*, *1*(4), 158–167. https://doi.org/10.1016/j.phanu.2013.05.001

Ruimy, R., & Andremont, A. (2004). Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation*, *13*, 176–184. https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2004.02.003

Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(11), 1–26. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427

Saadabi, A. M. A., & Ayoub, S. M. H. (2009). Comparative bioactivity of *Hydnora abyssinica* A. Braun against different groups of fungi and bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, *3*(4), 262–265.

Sandasi, M., Leonard, C. M., & Viljoen, A. M. (2010). The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, *50*(1), 30–35. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02747.x

Saranya, D. K., Rathinamala, J., & Jayashree, S. (2014). Bio-Fungicide potential of *Araucaria columnaris* (Cook Pine) aqueous resin extract against major phytopathogens. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, *4*(3), 2108–2112.

Sarri, M., Boudjelal, A., Hendel, N., Sarri, D., & Benkhaled, A. (2015). Flora and ethnobotany of medicinal plants in the southeast of the capital of Hodna (Algeria). *Arabian Journal of Medicinal & Aromatic Plants*, *1*(1), 24–30.

Sarri, M., Sarri, D., Hendel, N., & Boudjelal, A. (2012). Ethnobotanical study of therapeutic plants used to treat arterial hypertension in the Hodna region of Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants and Indigenous Medicine*, *1*(9), 411–417.

Satil, F., Selvi, S., & Polat, R. (2011). Ethnic uses of pine resin production from *Pinus brutia* by native people on the Kazdag Mountain (Mt. Ida) in Western Turkey. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *9*(3–4), 1059–1063.

Schauder, S., Shokat, K., Surette, M. G., & Bassler, B. L. (2001). The LuxS family of bacterial autoinducers: Biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, *41*(2), 463–476. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02532.x

Schiller, G., & Grunwald, C. (1986). Xylem resin monoterpene composition of *Pinus halepensis* Mill. in Israel1. *Israel Journal of Botany*, *35*(1), 23–33. https://doi.org/10.1080/0021213X.1986.10677035

Schiller, G., & Grunwald, C. (1987). Cortex resin monoterpene composition in *Pinus brutia* provenances grown in Israel. *Biochemical Systematics and Ecology*, *15*(4), 389–394. https://doi.org/10.1016/0305-1978(87)90051-2

Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R. R., Alviano, C. S., & Costa, S. S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *96*(3), 563–568. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.007

Schuster, M., Urbanowski, M. L., & Greenberg, E. P. (2004). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *PNAS*, *101*(45), 15833–15839. https://doi.org/DOI:10.1073/pnas.0407229101

Senouci, F., Ababou, A., & Chouieb, M. (2019). Ethnobotanical survey of the medicinal plants used in the southern mediterranean. case study: the region of Bissa (Northeastern Dahra Mountains, Algeria). *Pharmacognosy Journal*, *11*(4), 647–659. https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.103

Shams Ghahfarokhi, M., Goodarzi, M., Abyaneh, M. R., Al-Tiraihi, T., & Seyedipour, G. (2004). Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, *75*(7–8), 645–655. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.06.009

Sharma, A., Goyal, R., & Sharma, L. (2016). Potential biological efficacy of *Pinus* plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1011-6

Shuaib, M., Ali, M., Ahamad, J., Naquvi, K. J., & Ahmad, M. I. (2013). Pharmacognosy of *Pinus roxburghii* : A Review. *Phytochemistry*, *2*(1), 262–268. https://www.researchgate.net/publication/250615628

Simard, F. (2007). *Évaluation du potentiel anticancéreux des extractibles du bois de pin rouge.* Maîtrise en ressources renouvelables, Université du Quebec. https://doi.org/DOI: l0.t002/ptr.24J6

Singh P. S., Vidyasagar G.M. (2015 a). Antifungal screening of 61 folkloric medicinal plant extracts against dermatophytic fungi *Trichophyton rubrum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science,* 5(5), 038-044. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50507

Singh, P. S., Vidyasagar, G.M. (2015b). Antifungal screening of 61 traditional medicinal plants of 305 extracts against dermatophytic fungi *Trichophyton tonsurans*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 7 (3), 186-190.

Sipponen, A. (2013). *Coniferous Resin Salve , Ancient and Effective Treatment for Chronic Wounds – Laboratory and Clinical Studies*. Doctoral dissertation (article-based), Department of Orthopedics and Traumatology, Helsinki University Hospital, University of Helsinki, (Helsinki, Finland, pp.88). http://hdl.handle.net/10138/39074

Sipponen, P., Sipponen, A., Lohi, J., Soini, M., Tapanainen, R., & Jokinen, J. J. (2013). Natural coniferous resin lacquer in treatment of toenail onychomycosis: An observational study. *Mycoses*, *56*(3), 289–296. https://doi.org/10.1111/myc.12019

Soto-Rodriguez, S. A., Roque, A., Lizarraga-Partida, M. L., Guerra-Flores, A. L., & Gomez-Gil, B. (2003). Virulence of luminous *Vibrio* to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms*, *53*(3), 231–240. https://doi.org/10.3354/dao053231

Stepp, J. R. (2004). The role of weeds as sources of pharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*(2–3), 163–166. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.002

Sun, T., & Ho, C. T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, *90*(4), 743–749. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.035

Taj UrRahman, T., Uddin, G., Khattak, K. F., Liaqat, W., & Choudhary, M. I. (2016). Antibacterial, antifungal, insecticidal, cytotoxic and phytotoxic activities of the crude extracts of *Taxus wallichiana* Zucc twigs. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *8*(1), 420–424

Tan, L. Y., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2012). Silencing quorum sensing through extracts of *Melicope lunu-ankenda*. *Sensors*, *12*(4), 4339–4351. https://doi.org/10.3390/s120404339

Tillah, M., Batubara, I., & Sari, R. K. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of resins and essential oil from pine (*Pinus merkusii*, *Pinus ocarpa*, *Pinus insularis*) and *Agathis* (*Agathis loranthifolia*). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *9*(1), 134–139. https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v9i1.8371

Torres, M., Romero, M., Prado, S., Dubert, J., Tahrioui, A., Otero, A., & Llamas, I. (2013). N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures. *Microbiological Research*, *168*(9), 547–554. https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.04.011

Trapp, S., & Croteau, R. (2001). Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual Review of Plant Biology*, *52*, 689–724. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.689

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

Ulukanli, Z., Karabörklü, S., Bozok, F., Ates, B., Erdogan, S., Cenet, M., & Karaaslan, M. G. (2014). Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *12*(12), 901–910. https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60133-3

Välimaa, A. L., Honkalampi-Hämäläinen, U., Pietarinen, S., Willför, S., Holmbom, B., & von Wright, A. (2007). Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, *115*(2), 235–243. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.031

Vasavi, H. S., Arun, A. B., & Rekha, P. D. (2014). Anti-quorum sensing activity of *Psidium guajava* L. flavonoids against *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology and Immunology*, *58*(5), 286–293. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12150

Venugopal, P. V., & Venugopal, T. V. (1995). Antidermatophytic activity of garlic (*Allium Sativum*) *in Vitro*. *International Journal of Dermatology*, *34*(4), 278–279. https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1995.tb01597.x

Vio-Michaelis, S., Apablaza-Hidalgo, G., Gómez, M., Peña-Vera, R., & Montenegro, G. (2012). Antifungal activity of three chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. *Botanical Sciences*, *90*(2), 179–183.

Viswanathan, P., Suneeva, S.C., & Rathinam, P. (2015). Quorum Sensing in pathogenesis and virulence. In Kalia, V. C. (Ed.), *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*. (Springer, pp. 39-50). Delhi, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1982-8

Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, Elizabeth A. Engstrom, E., Coleman, J. P., & Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *187*(13), 4372–4380. https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4372

Weissmann, G. (1983). Studies on pine bark extracts. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, *3*(1), 31–35. https://doi.org/10.1016/0143-7496(83)90050-7

White, T. C., Findley, K., Thomas, L. D. J., Scheynius, A., Boekhout, T., Cuomo, C. A., Xu, J., & Saunders, C. W. (2014). Fungi on the Skin : Dermatophytes and Malassezia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(a019802), 1–16.

Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L., & Salmond, G. P. C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*, 365–404. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x

Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M., & Williams, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-IL and PA-IIL Are controlled by quorum sensing and by RpoS. *Journal of Bacteriology*, *182*(22), 6401–6411. https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6401-6411.2000.Updated

Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940–949. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038

Yassaa, N., Meklati, B. Y., & Cecinato, A. (2000). Evaluation of monoterpenic biogenic volatile organic compounds in ambient air around *Eucalyptus globulus*, *Pinus halepensis* and *Cedrus atlantica* trees growing in Algiers city area by chiral and achiral capillary gas chromatography. *Atmospheric Environment*, *34*(17), 2809–2816. https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00436-7

Zeng, X., Liu, X., Bian, J., Pei, G., Dai, H., Polyak, S. W., Song, F., Ma, L., Wang, Y., & Zhang, L. (2011). Synergistic effect of 14-alpha-lipoyl andrographolide and various antibiotics on the formation of biofilms and production of exopolysaccharide and pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(6), 3015–3017. https://doi.org/10.1128/AAC.00575-10

Zhang, X., Yang, L. M., Liu, G. M., Liu, Y. J., Zheng, C. B., Lv, Y. J., Li, H. Z., & Zheng, Y. T. (2012). Potent anti-HIV activities and mechanisms of action of a pine cone extract from *Pinus yunnanensis*. *Molecules*, *17*(6), 6916–6929. https://doi.org/10.3390/molecules17066916

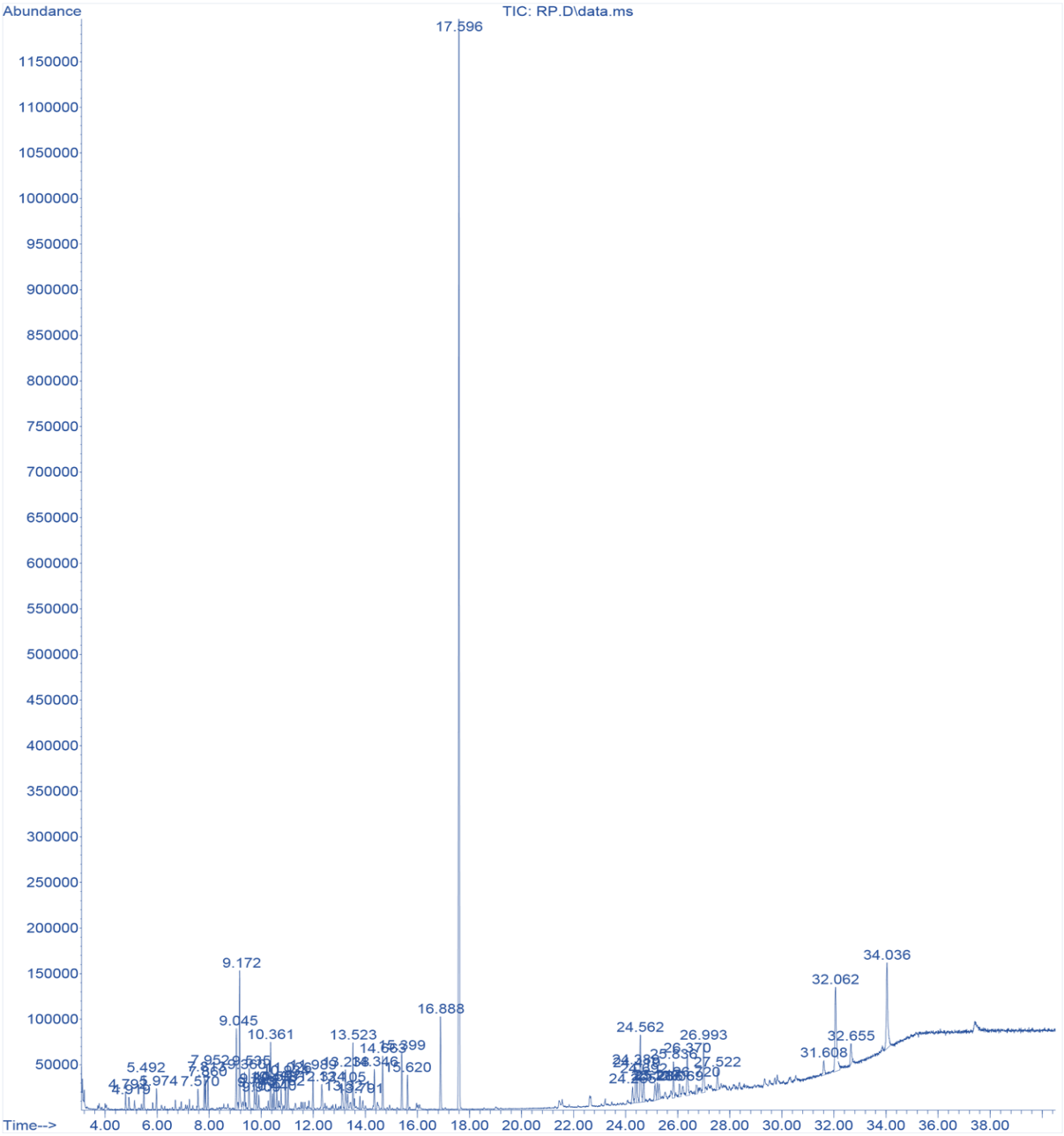
Zhao, X., Yu, Z., & Ding, T. (2020). Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria. *Microorganisms*, *8*(3), 1–5. https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425

Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y., Yu, W., & Gong, Q. (2013). Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology Letters*, *35*(4), 631–637. https://doi.org/10.1007/s10529-012-1126-x

Zink, B. Y. W. (1996). *Pycnogenol and Skincare*. *44*(January), 1–9.

Annexe : Rapport de la composition chimique de l'EALRP par GC/MS

File :C:\msdchem\1\data\A-013\PROPOLEO\RP.D
Operator :
Acquired : 28 Jun 2013 17:43 using AcqMethod PROPOLEO.M
Instrument : GCMSD
Sample Name: RP Misc Info :
Vial Number: 3
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e



Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	4.793	0.49	C:\Database\NBS75K.L			
			Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6	9851	000080-57-9	93
			,6-trimethyl-			
			D-Verbenone	9853	018309-32-5	90
			Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6	66810	000080-57-9	60
			,6-trimethyl-			
2	4.918	0.40	C:\Database\NBS75K.L			
			Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-	69846	018297-63-7	59
			Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-	69847	018297-63-7	50
			Urea, N,N'-bis(trimethylsilyl)-	23651	018297-63-7	40
3	5.493	0.87	C:\Database\NBS75K.L			
			Trimethylsilyl ether of glycerol	43898	006787-10-6	91
			Ribo-hexos-3-ulose, 2,4,5,6-tetrak	59532	062108-14-9	72
			is-O-(trimethylsilyl)-, bis(O-meth			
			yloxime)			
			Trimethylsilyl ether of glycerol	72913	006787-10-6	68
4	5.974	0.58	C:\Database\NBS75K.L			
			Butanedioic acid, bis(trimethylsil	71776	040309-57-7	64
			yl) ester			
			Butanedioic acid, bis(trimethylsil	71773	040309-57-7	64
			yl) ester			
			Butanedioic acid, bis(trimethylsil	71775	040309-57-7	64
			yl) ester			
5	7.568	0.58	C:\Database\NBS75K.L			
			1-Naphthalenecarbonitrile, 5,6,7,8	11768	029809-13-0	35
			-tetrahydro-			
			2,6-Difluoroaniline	65154	005509-65-9	30
			Silane, (cyclohexyloxy)trimethyl-	15717	013871-89-1	27
6	7.811	0.82	C:\Database\NBS75K.L			
			Naphthalene, 1,6-dimethyl-4-(1-met	22544	000483-78-3	27
			hylethyl)-			
			Benzene, ethylphenoxy-	22520	054852-74-3	27
			.beta.-Carboline, 6-methoxy-	22364	000000-00-0	27
7	7.861	0.71	C:\Database\NBS75K.L			
			Cyclohexanone, 4-(methylthio)-	8324	023510-98-7	27
			Benzenebutanoic acid, .beta.-(dime	30872	054966-40-4	25
			thylamino)-, ethyl ester			
			Benzene, 1-bromo-4-(1,3-dimethyl-2	31455	074630-78-7	25
			-butenyl)-			
8	7.955	1.01	C:\Database\NBS75K.L			
			4-Pyrimidinamine, 5-methyl-N,N-bis	20988	000000-00-0	23

(1-methylethyl)-
p-Tolyl-3-methylbutyrate 20731 000000-00-0 23 Benzene, 1-(1,3-dimethoxypropoxy)- 25358 074810-86-9 9
2-methyl-

9 9.043 2.09 C:\Database\NBS75K.L
1H-Pyrido[3,4-b]indole, 1-ethyl-2, 23000 006678-86-0 42
3,4,9-tetrahydro-
1H-Pyrido[3,4-b]indole, 1-butyl-2, 29670 006649-86-1 42
3,4,9-tetrahydro-
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

Pyridium bromide, 1-methyl-4-[4-hy 19505 000000-00-0 38
droxyphenyl]-

10 9.174 3.84 C:\Database\NBS75K.L
Benzaldehyde, 3-methoxy-4-[(trimet 28577 006689-43-6 95
hylsilyl)oxy]-
9H-Carbazole, 9-(1-methylethyl)- 25157 001484-09-9 47 1H-Benzimidazole, 2-
phenyl-, 3-oxi 25366 007436-57-9 32
de

11 9.361 0.97 C:\Database\NBS75K.L
3-Methoxybenzoylformic acid, TMS 34251 000000-00-0 35 (E)-2-Fluoro-3-(4-
N,N-dimethylamin 31261 000000-00-0 27
ephenyl)-propenoic acid, ethyl est
er
1,2,4-Oxadiazol-3-amine, N,5-diphe 31283 058599-06-7 16
nyl-

12 9.536 1.38 C:\Database\NBS75K.L
Thiazolo[3,2-a]pyridinium, 2,3-dih 32518 039137-97-8 46
ydro-8-hydroxy-5-methyl-2-phenyl-,
hydroxide, inner salt
1,3-Dioxolo[4,5-g]furo[2,3-b]quino 32510 000524-89-0 28
line, 9-methoxy-
2H,8H-Benzo[1,2-b:3,4-b']dipyran-2 35537 006054-10-0 25
-one, 6-methoxy-8,8-dimethyl-

13 9.742 0.69 C:\Database\NBS75K.L
Silane, [1-(5-ethenyltetrahydro-5- 32305 057428-80-5 37
methyl-2-furanyl)-1-methylethoxy]t
rimethyl-, cis Galactose, 2-amino-2-dioxy-, tetra 57802 056145-07-4 32
kis(trimethylsilyl) deriv.
Silane, [1-(5-ethenyltetrahydro-5- 32306 057397-14-5 25
methyl-2-furanyl)-1-methylethoxy]t
rimethyl-, trans-

14 9.824 0.69 C:\Database\NBS75K.L

Silane, [(1-ethyloctyl)oxy]trimeth 29970 061180-95-8 35
yl-
Silane, [(1-ethyldecyl)oxy]trimeth 35552 039789-26-9 32
yl-
Propanoic acid, 3-(trimethylsilyl) 8761 005683-30-7 27

15 9.911 0.37 C:\Database\NBS75K.L
3',5'-Bis(trifluoromethyl)acetophe 35004 030071-93-3 43
none
Benzoic acid, 4,5-dimethoxy-2-nitr 32109 026791-93-5 40
o-, methyl ester
6H-Cyclohepta[b]quinoline-11-carbo 32173 007101-63-5 37
xylic acid, 7,8,9,10-tetrahydro-

16 10.361 1.78 C:\Database\NBS75K.L
Benzoic acid, 4-[(trimethylsilyl)o 72305 002078-13-9 47
xy]-, trimethylsilyl ester
4-Trimethylsilyl-9,9-dimethyl-9-si 39804 058263-56-2 43
lafluorene
Benzoic acid, 4-[(trimethylsilyl)o 72303 002078-13-9 35 Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

xy]-, trimethylsilyl ester

17 10.442 0.40 C:\Database\NBS75K.L
.alpha.-DL-Lyxofuranoside, methyl 52170 056390-03-5 59
2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-
.alpha.-l-Galactofuranoside, methy 53392 056227-31-7 53
1 6-deoxy-2,3,5-tris-O-(trimethyls
ilyl)-
Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis- 56367 055399-49-0 52
O-(trimethylsilyl)-

18 10.499 0.63 C:\Database\NBS75K.L
d-Arabinose, tetrakis(trimethylsil 56380 018622-97-4 91
yl)-
D-Ribose, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trim 74445 033648-69-0 91
ethylsilyl)-
.beta.-L-Arabinopyranose, 1,2,3,4- 56370 032166-73-7 91
tetrakis-O-(trimethylsilo)-

19 10.599 0.72 C:\Database\NBS75K.L
1H,3H-Thieno[3,4-c]thiophene, 4,6- 15073 015441-54-0 14
dimethyl-
Quinoline, 4-isobutyl- 19229 007661-51-0 12 p-Benzoquinone, 2-hydroxy-
5-(methy 15002 019346-89-5 10
lthio)-

20 10.761 0.63 C:\Database\NBS75K.L
Silane, [1-(5-ethenyltetrahydro-5- 32306 057397-14-5 64

methyl-2-furanyl)-1-methylethoxy]t
rimethyl-, trans-
Silane, [1-(5-ethenyltetrahydro-5- 32305 057428-80-5 37
methyl-2-furanyl)-1-methylethoxy]t
rimethyl-, cis-
Silane, trimethyl[1-methyl-1-(4-me 29149 057304-99-1 10
thyl-3-cyclohexen-1-yl)ethoxy]-, (
S)

21 10.936 0.81 C:\Database\NBS75K.L
.beta.-L-Arabinopyranose, 1,2,3,4- 56370 032166-73-7 91
tetrakis-O-(trimethylsilo)-
Arabinose, 2,3,4,5-tetrakis-O-(tri 56378 001768-95-2 91
methylsilyl)-
D-Ribose, 2,3,4,5-tetrakis-O-(trim 74445 033648-69-0 91
ethylsilyl)-

22 11.023 0.87 C:\Database\NBS75K.L
1H-Pyrido[3,4-b]indole, 2,3,4,9-te 19513 002506-10-7 30
trahydro-1-methyl-
Canavanine, tetra(trimethylsilyl)- 57669 000000-00-0 17 Pyrimidine, 5-hydroxy-4-
phenyl- 15728 088070-43-3 16

23 11.992 0.97 C:\Database\NBS75K.L
Xylitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(tri 59259 014199-72-5 64
methylsilyl)-
Arabinitol, pentakis-O-(trimethyls 59258 025138-28-7 58
ilyl)-
Xylitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(tri 74648 014199-72-5 58
methylsilyl)-

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

---

24 12.323 1.00 C:\Database\NBS75K.L
Benzoic acid, 3-methoxy-4-[(trimet 44439 002078-15-1 98
hylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl est
er
Benzoic acid, 3-[(trimethylsilyl)o 72302 003782-84-1 50
xy]-, trimethylsilyl ester
Benzoic acid, 3-[(trimethylsilyl)o 39708 003782-84-1 35
xy]-, trimethylsilyl ester

25 13.104 0.97 C:\Database\NBS75K.L
Benzoic acid, 3,4-bis[(trimethylsi 73977 002347-40-2 99
lyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
Benzoic acid, 3,4-bis[(trimethylsi 73976 002347-40-2 99
lyl)oxy]-, trimethylsilyl ester
Benzoic acid, 3,4-bis(trimethylsil 44437 027798-58-9 30
oxy)-, methyl ester

26 13.236 1.25 C:\Database\NBS75K.L
Arabinofuranose, 1,2,3,5-tetrakis- 56367 055399-49-0 62
O-(trimethylsilyl)-
.alpha.-DL-Lyxofuranoside, methyl 52170 056390-03-5 53
2,3,5-tris-O-(trimethylsilyl)-
D-Xylofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O 56368 056271-68-2 45
-(trimethylsilyl)-

27 13.323 0.59 C:\Database\NBS75K.L
D-Xylopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O 56372 055555-45-8 53
-(trimethylsilyl)-
.beta.-D-Xylopyranose, 1,2,3,4-tet 56361 018623-27-3 53
rakis-O-(trimethylsilyl)-
Sorbose, pentakis(trimethylsilyl)- 59866 000000-00-0 53

28 13.523 1.80 C:\Database\NBS75K.L
2H-1-Benzopyran-2-one, 3-(1,1-dime 35900 019723-23-0 46
thyl-2-propenyl)-7-hydroxy-6-metho
xy-
Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(t 60998 029412-25-7 43
rimethylsilyl)-, D-chiro-
Benzene, 1,3,5-tris(2,2-dimethylpr 47325 040572-19-8 35
opyl)-2-nitro-

29 13.792 0.34 C:\Database\NBS75K.L
1,2,3,3a-Tetrahydro-6-methoxy-10-(45644 056005-87-9 32
3-methoxyphenyl)benzo[c]cyclopenta
[f]-1,2-diazepine
Phenothiazine, 3-chloro-10-methyl- 41447 022799-53-7 14
7-nitro-
10H-Phenothiazine, 3-chloro-10-met 41448 035076-84-7 14
hyl-7-nitro-

30 14.348 1.20 C:\Database\NBS75K.L
D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(t 74676 006736-97-6 91
rimethylsilyl)-
.alpha.-D-Galactopyranose, 1,2,3,4 59884 032166-80-6 91
,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-
.beta.-D-Glucopyranose, 1,2,3,4,6- 74677 002775-90-8 90
pentakis-O-(trimethylsilyl)-
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

---

31 14.660 1.48 C:\Database\NBS75K.L
3,6-Dihydroxy-7,8-dimethyl-2-(2-pr 43979 000000-00-0 10
openyl)phenanthrene-1,4-dione
Nitrophenide 43890 000537-91-7 10 Phenol, 4-phenyl-2',3',4',5'-tetra 43625 067651-34-7 9
chloro-

32 15.398 1.58 C:\Database\NBS75K.L
Trimethylsilyl 3,4-bis(trimethylsi 53524 010586-03-5 86
loxy)cinnamate
Trimethylsilyl 3,4-bis(trimethylsi 74215 010586-03-5 64
loxy)cinnamate
Benzo[1,2-c:4,5-c']dipyrrole-1,3,5 53561 031663-75-9 17
,7(2H,6H)-tetrone, 2,6-bis(4-methy
lphenyl)-

33 15.623 1.00 C:\Database\NBS75K.L
Talose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trim 59873 056192-85-9 91
ethylsilyl)-
D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(t 59872 006736-97-6 91
rimethylsilyl)-
.alpha.-D-Glucopyranose, 1,2,3,4,6 59880 003327-61-5 91
-pentakis-O-(trimethylsilyl)-

34 16.891 2.73 C:\Database\NBS75K.L
Cinnamic acid, 4-methoxy-3-(trimet 47882 032342-04-4 95
hylsiloxy)-, trimethylsilyl ester
Trimethylsilyl 3-methoxy-4-(trimet 73530 010517-09-6 87
hylsilyloxy)cinnamate
Trimethylsilyl 3-methoxy-4-(trimet 47883 010517-09-6 86
hylsilyloxy)cinnamate

35 17.597 33.94 C:\Database\NBS75K.L
Trimethylsilyl 3,4-bis(trimethylsi 53524 010586-03-5 81
loxy)cinnamate
Trimethylsilyl 3,4-bis(trimethylsi 74215 010586-03-5 46
loxy)cinnamate
2,4-Imidazolidinedione, 1,3-diethy 53545 057326-26-8 25
1 5-phenyl-5-[4-[(trimethylsilyl)o
xy]phenyl]-

36 24.265 0.70 C:\Database\NBS75K.L
Demecolcine 74002 000477-30-5 35 Morphinan-6-ol, 7,8-didehydro-
4,5- 51474 000000-00-0 11
epoxy-3-methoxy-17-methyl-6-(trime thylsilyl)-,(5.alpha.,6.alpha.)-
Cyclotrisiloxane, hexamethyl- 70586 000541-05-9 10

37 24.390 1.44 C:\Database\NBS75K.L
5.beta.-Podocarpa-8,11,13-trien-16 38151 003745-36-6 12 -oic acid, methyl ester
2,5-Dimethoxy-4-(methylsulfoxide)a 35297 000000-00-0 12
mphetamine
Vinyltripentylsilane 37411 000000-00-0 12

38 24.421 1.22 C:\Database\NBS75K.L
2-Methyl-3,7-diphenylindole 40013 001863-20-3 41 Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

Pregn-4-ene-3,20-dione, 6-methyl-1 55080 069833-55-2 32
7-[(trimethylsilyl)oxy]-, (6.alpha
.)-
Aniline, 5-bromo-2-(p-fluorophenox 39549 031081-30-8 27
y)-

39 24.565 3.05 C:\Database\NBS75K.L
[1,1'-Biphenyl]-4,4'-diol, 3,3'-di 33064 004433-09-4 45
methoxy-
8-Fluorobenzo[a]anthracene 33138 000000-00-0 45 5-
Fluorobenzo[a]anthracene 33137 000000-00-0 45

40 24.690 1.07 C:\Database\NBS75K.L
2-Methyl-3,7-diphenylindole 40013 001863-20-3 58 Aniline, 5-bromo-2-(p-
fluorophenox 39549 031081-30-8 38
y)-
Anthracene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahy 42537 022306-30-5 38
dro-1,1,4,4,5,5,8,8-octamethyl-

41 25.121 0.83 C:\Database\NBS75K.L
2-(Acetoxymethyl)-3-(methoxycarbon 39781 093103-70-9 38
yl)biphenylene
3,3-Diethoxy-1,1,1,5,5,5-hexamethy 41981 000000-00-0 37
ltrisiloxane
1,1,1,3,5,5,5-Heptamethyltrisiloxa 27934 001873-88-7 35
ne

42 25.215 0.69 C:\Database\NBS75K.L
Silanol, trimethyl-, phosphate (3: 73072 010497-05-9 43
1)
7H-Dibenzo[c,h]phenothiazine 42647 000224-72-6 38 6H-Dibenzo[b,d]pyran-
9-methanol, 6 46965 026108-40-7 32
a,7,8,10a-tetrahydro-1-hydroxy-6,6
-dimethyl-3-pentyl-

43 25.283 0.72 C:\Database\NBS75K.L
2-(Acetoxymethyl)-3-(methoxycarbon 39781 093103-70-9 35
yl)biphenylene
3,3-Diethoxy-1,1,1,5,5,5-hexamethy 41981 000000-00-0 32
ltrisiloxane
3-Methyl-2-phenylindole 24653 010257-92-8 30

44 25.833 1.40 C:\Database\NBS75K.L
4a,7a-Epoxy-5H-cyclopenta[a]cyclop 59746 051906-02-6 9
ropa[f]cycloundecen-4(1H)-one, 2,7 ,10,11-tetrakis(acetyloxy)-
1a,2,3, 6,7,10,11,11a-octahydro-1,1,3,6,9 pentamethyl-, [1ar-
(1ar@,2R@,3S@,4 ar@,6S@,7S@,7as@,8E,10R@,11R@,11as
@)]-
Digoxigenin-TMS 59753 028371-18-8 5
Heptamethylvinyloctasilsesquioxane 60027 000000-00-0 4

45 26.071 0.61 C:\Database\NBS75K.L
Tranylcypromine, pentafluorobenzoy 46452 000000-00-0 52
l ester
Cyclotrisiloxane, hexamethyl- 70586 000541-05-9 47
Silane, trimethyl[5-methyl-2-(1-me 28135 055012-80-1 47 Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

thylethyl)phenoxy]-

46 26.371 1.99 C:\Database\NBS75K.L
4a,7a-Epoxy-5H-cyclopenta[a]cyclop 59746 051906-02-6 10
ropa[f]cycloundecen-4(1H)-one, 2,7 ,10,11-tetrakis(acetyloxy)-
1a,2,3, 6,7,10,11,11a-octahydro-1,1,3,6,9 pentamethyl-, [1ar-
(1ar@,2R@,3S@,4 ar@,6S@,7S@,7as@,8E,10R@,11R@,11as
@)]-
Heptamethylvinyloctasilsesquioxane 60027 000000-00-0 4

47 26.721 0.63 C:\Database\NBS75K.L
Acetic acid, [4-(1,1-dimethylethyl 28121 088530-52-3 35
)phenoxy]-, methyl ester
3,3-Diisopropoxy-1,1,1,5,5,5-hexam 46031 018082-56-9 35
ethyltrisiloxane
Silane, trimethyl[5-methyl-2-(1-me 28135 055012-80-1 35
thylethyl)phenoxy]-

48 26.996 2.21 C:\Database\NBS75K.L
Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3,4- 57477 074299-16-4 53
bis[(trimethylsilyl)oxy]-, O-methy
loxime
Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 2,3- 57475 074299-41-5 47
bis[(trimethylsilyl)oxy]-, O-methy
loxime
1'H-Cholest-3-eno[3,4-b]indole, (5 57490 034535-55-2 38
.alpha.)-

49 27.521 0.82 C:\Database\NBS75K.L
Tetrasiloxane, decamethyl- 72967 000141-62-8 27
Cyclotrisiloxane, hexamethyl- 70586 000541-05-9 25 Silane, trimethyl[5-
methyl-2-(1-me 28135 055012-80-1 22
thylethyl)phenoxy]-

50 31.607 0.79 C:\Database\NBS75K.L
3,3-Diethoxy-1,1,1,5,5,5-hexamethy 41981 000000-00-0 42
ltrisiloxane
Tetrasiloxane, decamethyl- 72967 000141-62-8 38 3,3-Diisopropoxy-
1,1,1,5,5,5-hexam 46031 018082-56-9 38
ethyltrisiloxane

51 32.064 5.53 C:\Database\NBS75K.L
(3R)-trans-Dihydro-3,4-bis[(4-hydr 58983 000000-00-0 99

oxy-3-methoxyphenyl)methyl]-2(3H) furanone di-TMS
(matairesinol)
Benzoic acid, 2-[(trimethylsilyl)o 28581 018001-14-4 38
xy]-, methyl ester
Benzeneacetic acid, 3-methoxy-.alp 46284 055530-67-1 27
ha.-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimet
hylsilyl ester

52 32.657 1.03 C:\Database\NBS75K.L
3,3-Diethoxy-1,1,1,5,5,5-hexamethy 41981 000000-00-0 47
ltrisiloxane
2-(Acetoxymethyl)-3-(methoxycarbon 39781 093103-70-9 38
yl)biphenylene
Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk# RT Area% Library/ID Ref# CAS# Qual

2-(2-Aminophenyl)benzimidazole 25128 005805-39-0 35

53 34.038 5.09 C:\Database\NBS75K.L
1,2-Benzenediol, 3,5-bis(1,1-dimet 28157 001020-31-1 22
hylethyl)-
Cyclotrisiloxane, hexamethyl- 27918 000541-05-9 22
N-Cyano-N',N',N'',N''-tetramethyl- 24502 074150-88-2 22
1,3,5-triazinetriamine

JMBFS
Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences
International peer-reviewed scientific online journal
Published by Faculty of Biotechnology and Food Sciences

LYOPHILIZED AQUEOUS EXTRACT OF *PINUS HALEPENSIS* (MILL.) RESIN: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIDERMATOPHYTIC ACTIVITIES

Nora Haichour[1], Samia Mezaache-Aichour[1], Elkhamsa Soltani[2], Sousen Kada[2], José Rodríguez Martínez[3], Maria Angel Esteban[4], Jane Nicklin[5] and Mohamed Mihoub Zerroug[1]*

Address(es):
[1]Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 19137 Sétif, Algérie. Tel. 213 36 62 01 40/ 213 7 74 06 58 78.
[2]Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 19137 Sétif, Algérie.
[3]Chief of Section Scientific Instrumentation Service (SUIC), Espinardo Campus, University of Murcia, 30100 Espinardo. Murcia, Spain.
[4]Fish Innate Immune System Group, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, 30100 Murcia, Spain..
[5]Department of Biological Sciences, Institute of Structural and Molecular Biology, School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London, Malet Street, London WC1E 7HX,UK.

*Corresponding author: med.zerroug@univ-setif.dz

https://doi.org/10.15414/jmbfs.3423

ARTICLE INFO

Received 10. 7. 2020
Revised 18. 5. 2021
Accepted 18. 5. 2021
Published 1. 10. 2021

Regular article

OPEN ACCESS

ABSTRACT

In traditional Algerian medicine, *Pinus halepensis* (Mill.) resin is used as antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, wound healer, for the treatment of respiratory and urinary diseases. In the present study, a lyophilized aqueous extract (LAE) of *Pinus halepensis* (Mill.) resin is subjected to chemical composition analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), antioxidant activity was evaluated *in vitro* using 2,2-diphenyl-b,picrylhydrazyl (DPPH) and β-carotene bleaching assays. LAE of *Pinus halepensis* (Mill.) resin was also tested for its potential activity against four dermatophytic fungi: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*. Results showed that LAE of *Pinus halepensis* (Mill.) resin contained 64.57% of aromatic compounds. This extract contains also succinic acid, sugars and alcohol sugars, alkaloids and other compounds that represent respectively 0.58%, 6.45%, 0.87% and 2.05%. The obtained extract exhibited satisfying antioxidant activity with an inhibition percentage of 93.76±0.41 at a concentration of 300 µg/mL and IC_{50} of 83.64µg/mL by the DPPH method. The tested extract showed also a good antioxidant activity using β-carotene test. At resin concentration of 100 µg/mL antifungal tests showed, inhibition rates of 58.9%, 58.44%, 41.36% and 34.43% against *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* respectively. Upon the obtained results, this extract can be used as external treatments for wounds to prevent oxidation and fungal infections.

Keywords: *Pinus halepensis*, resin, GC/MS, antioxidant activity, antifungal activity

INTRODUCTION

Plants have been used as an important source of medicine since ancient times and their products are being used for different purposes such as medicine, food, health care, agriculture, agrochemicals, pharmaceutical, etc. The medicinal properties of different plant species have contributed to the origin and evolution of many traditional herbal therapies (**Malik *et al.*, 2012**). The importance of medicinal plants lies in their biological active principles, which are the real healers in the process of medication (**Kumar, 2009**).
The Aleppo pine or *Pinus halepensis*is (Mill.) is a tree species of primary importance in the Mediterranean by the area it occupies and the role it plays in the economy of countries in this region (**Nahal, 1962**). The resins are considered to play a role in the defence of the coniferous trees against insects and microbial pathogens (**Trapp and Croteau, 2001**). Natural coniferous resins extracts are raw materials for various products in the industry and have been used as traditional medicines as a homemade salve for skin wounds and infections (**Sipponen, 2013**). Natural resins have a very wide range of applications, mainly used in industries coatings (varnishes, lacquers, paints, sealants, cements, adhesives...), printing (printing inks...), stationery (paper sizing), polymers (adhesives, rubber, various materials). Gums and many resins are also the sources of varied products for the food industry, perfumery, cosmetics, pharmacy and medicine (**Delmond, 2002; Ghanmi *et al.*, 2007**).
Several medical traditionally uses of *P. halepensis* (Mill.) were recorded in Algeria according to regions and diseases. Different parts of pine were used in decoction; infusion, pine resin powder mixed with honey or olive oil (**Meddour and Meddour-Sahar, 2015**). Fruits infusion for the treatment of arterial hypertension (**Sarri *et al.*, 2012**), buds, leaves and resin decoction and poultice for the treatment of respiratory and urinary tract disorders, antiseptic and stimulant of adrenalglands (**Benderradji *et al.*, 2014**), fruits infusion and powder for haemorrhoids, tuberculosis, ulcer treatments and pulmonary conditions (**Sarri *et al.*, 2015**). Seeds decoction for the treatment of gastric and intestinal ulcers, respiratory infections, prostate infection, sterility, toothache (**Bouasla and Bouasla, 2017**), stomachache and kidney inflammation (**Senouci *et al.*, 2019**). Roots decoction for the treatment of respiratory disorders (**Chohra and Ferchichi, 2019**). The resin was used against rheumatism (**Rebbas *et al.*, 2012**), to treat asthma (**Meddour and Meddour-Sahar, 2015**), as antifungal (**Chermat and Gharzouli, 2015**) and to treat mainly burns, wounds and skin inflammation, in flu and cough cases (**Meddour and Meddour-Sahar, 2015**). Leaves, resin infusion and decoction for the treatment of respiratory ailments (bronchitis, pneumonia and colds), urinary problems, parasitosis and wounds (**Miara *et al.*, 2019**; **Bendif *et al.*, 2020**).
Several studies reported that the most important fungal species implied in dermatophytic diseases in Algeria belonged to *Tricophyton* genus. They were predominant in the Northeast, 66.68% including *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton tonsurans* **(Hammadi *et al.*, 2007).** *Trichophyton rubrum* was the predominant pathogen of feet and the inguinal folds in Sétif (**Ilham and Touabti, 2013**), *Trichophyton mentagrophytes* primarily responsible for the inflammatory disease in Batna (**Chelgham *et al.*, 2012).** While in 2016, **Ennaghra *et al.*** found that the occurrence of trichophytic was 72% among this percentage there were 24% *T. rubrum* and 16% *T. mentagrophytes*.
In the last decade most research done on pine in Algeria were focused on the organic solvent extraction of essential oils from aerial parts of the tree, spines (**Abi-Ayad *et al.*, 2011),** needles (**Fekih *et al.*, 2014; Dob *et al.*, 2005**), twigs and buds (**Fekih *et al.*, 2014**), flowering aerial parts (**Haichour *et al.*, 2020**) or pine

extracts, leave and bud decoction (**Berroukche *et al.*, 2014**), bark aqueous extract (**Kaouachi and Derouiche, 2018**), young ovulate cones methanolic extract (**Meziti *et al.*, 2019**) and seeds polysaccharides (**Abbou *et al.*, 2019**).
On the bases of the available literature about the extracts and the ethnobotanical use of *Pinus halepensis* (Mill.) and the biological activities focused on antioxidant and antifungal especially phytopathogenic fungi (**El Omari *et al.*, 2021**), the extract and the use of pine resin aqueous extract seem to be more close to the folk use of pine. Thus the aim of this work, which is in our knowledge the first study done in Algeria, was to determine the chemical composition as well as the antioxidant and antifungal activities of a lyophilized aqueous extract of *Pinus halepensis* (Mill.) resin collected in Sétif region (Northeast of Algeria).

MATERIAL AND METHODS

Preparation of lyophilized aqueous extract (LAE) of *Pinus halepensis* (Mill.) resin

Resin samples are collected in the north of Sétif region (in the Northeast of Algeria). A sample of 1.9 g of air-dried resin is ground into a fine powder in a blender and mixed with 90 mL boiling water by a magnetic stirrer for 4h. The aqueous extract was then filtered over cheesecloth and Whatman paper No. 1, respectively. The filtrates were frozen at -20°C in ultra-low temperature freezer and lyophilized in a dry freezer machine (Cryorivoire) under 260-mTorr pressure at-81°C (**Gülçin *et al.*, 2007**).

Chemical composition of LAE of *Pinus halepensis* (Mill.) resin by GC / MS

The identification of the components of LAE of *P. halepensis* resin was performed based on the gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) as described by **Mansouri *et al.* (2011)** and **Soltani *et al.* (2017)**. Five (5) mg of pine resin samples of LAE were mixed with 50µl of dry pyridine and 75µL N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoracetamide, heated at 80°C for 20 min and analyzed by GC-MS. This technique is performed using a Hewlett Packard Gas Chromatograph 6890 Series II Plus linked to Hewlett Packard 6972 mass spectrometer system equipped with capillary column HP5-MS (30 m long, 0.25 mm id and 0.5 µm film thicknesses). The column temperature is programmed from 100 to 325°C at a rate of 5°C/min. The carrier gas is helium with a flow rate set at 20 mL/min. The injection mode is Split (Split ratio 50:1, injector temperature 280°C). The identification of the compounds present in pine resin LAE samples is accomplished using computer searches on commercial libraries. In some cases, when identical spectra have not been found, only the structural type of the corresponding component was proposed based on its mass-spectral fragmentation. If available, reference compounds were co-chromatographed to confirm GC retention times. Components identification is verified by search in NIST Data Base using CAS numbers (http://webbook.nist.gov/chemistry/).

Antioxidant activity

Radical scavenging by DPPH method

Antioxidant activity of pine resin LAE is evaluated according to the DPPH (1,1-diphényl-di-picrylhydrazyl) method proposed by **Chen *et al.* (2004)** and **Que *et al.* (2006)**. Two (2) mL of LAE of *P. halepensis* (Mill.) resin solution (2mg/mL) and different concentrations of BHT (butylated hydroxytoluene) in distilled water are mixed with 2 mL of 0.1 mM DPPH solution in methanol. Control is prepared with the same method but the tested substance is substituted by distilled water. After 30 min in dark, DPPH discoloration is measured at 517 nm with a spectrophotometer (thermo- Sientific: HEΛIOS°490) using distilled water as blank. All tests are performed in triplicate. Extracts scavenger activity in % is calculated according to the following formula: scavenger activity in %= [(Ac – Ae)/Ac] x 100 where:
Ac= (Absorbance of control), Ae= (Absorbance of tested extract).
The graph of the inhibition percentage variation as a function of tested extract concentrations allows determining the IC_{50}, concentration corresponding to 50% inhibition of DPPH radicals.This value is compared to that recorded for the reference compound (BHT).

β-carotene bleaching test

The antioxidant capacity is determined by measuring inhibition of volatile organic compounds production and the formation of conjugated dienehydroperoxides arising from linoleic acid oxidation which results in the discoloration of β–carotene (**Krishnaiah *et al.*, 2011**). β-carotene bleaching test is realized according to the method described by **Sun and Ho (2005)**. In a flask, 1ml of β–Carotene solution (1 mg/mL of pure chloroform) is added to 25 µL of linoleic acid and 200 mg of the Tween 40 emulsifier mixture. After evaporation of the chloroform by rotary evaporator (Rotamantle) at 42°C, 100 mL of oxygen-saturated distilled water are added with vigorous shaking until emulsification. Next, 10 ml of this mixture are transferred into test tubes containing 2mL of distilled water (control), 2 mL of BHT solution (positive control, standard antioxidant) at 2mg/mL of methanol or 2 mL of different concentrations of the tested extract; all tests are performed in triplicate. As soon as the emulsion is added to each tube, the zero time point absorbance is measured at 490 nm by a spectrophotometer (thermo- Sientific: HEΛIOS°490), blank contains all emulsion components but devoid of β –carotene. After incubating emulsion for 2 h at 50°C, absorbance readings are taken at regular intervals (15min) until 2h (decolorized β–carotene).

Antifungal activity of resin LAE of *P.halepensis* (Mill.) resin

The LAE of *Pinus halepensis* (Mill.) resin was tested in plate based poisoned bait assays against four dermatophytic fungi *Trichophyton rubrum, Trichophyton equinum, Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton tonsurans* obtained from the laboratory of Dr. Jane Nicklin, School of Biological and Chemical Sciences, Birkbeck College, University of London, UK.
The dermatophytic fungi are cultivated on Sabouraud dextrose agar (Oxoid LTD, Basing Stoke, Hampshire, England). Resin LAE dissolved in methanol is added to the medium at the concentrations of 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100µg/mL. The medium containing the appropriate concentration of MeOH without pine resin extract is used as control. Plates are incubated at 25°C for 9 days. The fungal growth inhibition rates are calculated according to the equation: Inhibition %=[(Cd-Td)/Cd)]x100 where Cd: control colony diameter, Td: test colony diameter. Results converted to prohibit values (**Finney, 1971**), are plotted against the log2 of the dilution factor in order to determine the dilution required to inhibit germination by 50%.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD. Graphs were realized by Graph Pad Prism 8.4.2 Statistical software (Graph Pad Software, USA). Statistical significance of the difference was assessed by a two-way analysis of variance. Differences were considered significant at $p<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition of resin LAE of *P.halepensis* (Mill.)

Analysis of the chemical composition of the LAE of pine resin by GC/MS resulted in the identification of 53 compounds.The most representative results according to the NIST database (Table 1), are aromatic compounds such as cinnamic and benzoic acids derivatives that represent, quantitatively the most important fraction. Among phenolic compounds, cafeic acid area is 35.52%. Methyl ester of salicylic acid, 3,5-Bis (1,1-dimethylethyl) catechol, vanillin, [1,1'-biphenyl]-4,4'-diol, 3,3'-dimethoxy-, isoferulic acid, coumarin 3-(1,1-dimethylallyl)-7-hydroxy-6-methoxy-), *p*-salicylic acid (4-hydroxybenzoic acid), protocatechuic acid and even thymol are respectively present at percentages of 5.53, 5.09, 3.84, 3.05, 2.73, 1.80, 1.78, 0.97 and 0.63. Besides, the analysis reveals the presence of a variety of sugars representing 6.45%. This aqueous extract also contains succinic and phosphoric acids, D-verbenone and alkaloids as tetra hydroharmane. Total percentage area of identified compounds, referring to the NIST database, is 74.52%.
Natural resins are complex mixtures of several classes of compounds, the main ones as described by **Delmond (2002)** are in addition to essential oils and polysachrides, acid constituents, aliphatic as succinic acid, aromatic as benzoic and cinnamic acids and phenolic acids as salicylic, *p*-coumaric and ferulic acids combined as esters to resin alcohols (resinols and resinotannols) and phenolic compounds as urushiol. Natural resins contain also neutral constituents, essentially triterpenic in the majority (**Ghanmi *et al.*, 2007**), resin alcohols, free or as esters and are generally phenolic. The compounds present in greater quantities in the *Pinus* genus are mono or sesquiterpenes (**Ghanmi *et al.*, 2007**; **Simard, 2007; Abi-Ayad *et al.*, 2011)**, their concentrations vary with species. Several diterpenes were isolated from different parts of pines (**Simard, 2007**).
Earlier **Karepova *et al.* (1983)** reported that the aqueous extract of the woody verdure of *Pinus sylvestris* contained aliphatic mono-, di- and tricarboxylic acids and benzene carboxylic acids. Among aromatic acids, they found benzoic acid in the largest amounts. These results are consistent with the obtained results, *Pinus halepensis* (Mill.) resin LAE also contained aliphatic acids such as succinic acid and a significant amount of aromatic compounds such as benzoic and cinnamic acids derivatives greatly represented by cafeic acid. Sugars are present at 6.45%; these sugars derived probably from the hydrolysis of polysaccharides following sample boiling. This is reinforced by data of **Sipponen (2013)**, who found constantly coumaric acid (hydroxycinnamic acid), a group of resin acids (hydroxyabietic and abietic acids) and a group of lignans specially pinoresinolin natural coniferous resins and other terpenic wood extracts.

Table 1 Components of *Pinus halepensis* (Mill.) resin lyophilized aqueous extract identified by GC/MS

	Compounds	%area	Total % area
Linear hydrocarbon acids	succinic acid	0.58	0.58
Aromatic compounds and derivatives	2,6-Difluoroaniline or 2,6-difluoro Benzenamine	0.58	64.57
	Vanillin	3.84	
	3',5'-Bis(trifluoromethyl) acetophenone	0.3	
	4-Hydroxybenzoic acid *p*-Salicylic acid	1.78	
	vanillic acid	1.00	
	Protocatechuic acid	0.97	
	Coumarin, 3-(1,1-dimethylallyl)-7-hydroxy-6-methoxy-)	1.80	
	Isoferulic acid	2.73	
	Caffeic acid	35.52	
	[1,1'-Biphenyl]-4,4'-diol, 3,3'-dimethoxy- (or 4,4'-Biphenyldiol, 3,3'-dimethoxy-)	3.05	
	3-Methyl-2-phenylindole (3-Methyl-2-phenylindole	0.72	
	Thymol	0.63	
	M-methoxymandelic acid oumethyl ester of salicylic acid	5.53	
	2-(1H-benzimidazol-2-yl) aniline	1.03	
	3,5-Bis(1,1-dimethylethyl) catechol	5.09	
Sugars and their alcohols	Arabinose	2.69	6.45
	Xylitol	0.97	
	D-Xylopyranose	0.59	
	D-Glucose	2.20	
Alkaloids	Tetrahydroharmane	0.87	0.87
Others	Phosphoric acid	0.69	2.05
	D-Verbenone or 2-Pinen-4-one	0.49	
	ether of glycerol	0.87	

Antioxidant activity

Plants rich in flavonoids and phenolic acids are a good source of natural antioxidants. A positive and significant correlation existed between antioxidant activity and total phenolics (**Wojdyło *et al.*, 2007; Ignat *et al.*, 2011**). The pine bark provide a readily available source of dietary antioxidants **(Walia *et al.*, 2019).**

DPPH test

The test results of the free radicals scavenging effect from the LAE of pine resin and BHT (Fig. 1) demonstrate a fairly significant capacity for trapping the DPPH radical and are concentration-dependant. Maximum inhibition (93.76%±0.41) was recorded at 300µg/mL; however, at 200 µg/ml inhibition is already almost in a maximum of 92.23%±0.13. According to the results, the IC_{50} as determined from the trend curve is 83.64µg/mL (R^2 = 0.9642). The positive control BHT, also shows a scavenging DPPH power with an IC_{50} of 45.11µg/mL (R^2 = 0.9324). It is also noteworthy that the inhibition rate was over 90% at only 150 µg/mL and 200µg/mL for BHT and resin LAE respectively ($p<0.05$). The obtained IC_{50},was close to the IC_{50} obtained by **Abbou *et al.* (2019)** using of the propanol polysaccharide extract of *P. halepensis* (Mill.) seeds.

LAE pine resin contains important amounts of phenolic derivatives as cafeic, isoferulic, vanilic acids, vanillin, methyl ester of salicylic acid and *p*-salicylic acid. Indeed, **García-Pérez *et al.* (2010)** reported that polyphenolics from black spruce extract, obtained by hot water extraction is the most efficient antioxidant and showed the highest scavenging capacity among Canadian species (with EC_{50} 48.30 µg/mL and 1352.66 µg/mL toward H_2O_2 and NO respectively). The obtained aqueous pine resin extract has an EC_{50} lower than 83.64 µg/mL; it has then a good scavenging activity toward DPPH radicals. **García-Pérez *et al.* (2010)** reported that the ability of extracts to scavenge H_2O_2 is strongly associated with total phenolics, proanthocyanidins and cinnamic acids. Similarly, the ability of extracts to scavenge O_2^- was strongly correlated with total phenolics whereas the extracts ability to scavenge the OH radical was strongly correlated with the cinnamic acids content. These results suggest that overall antioxidant effect towards the H_2O_2 and O_2^- could be due to the synergistic influence of different phenolic classes present in the extract. According to **Bougandoura and Bendimerad (2013)**, the inhibition percentage of aqueous and methanolic extracts of *Satureja calamintha* was greater than 90% at concentrations of 4.624 and 5.0 mg/mL respectively. They also suggested that the power reducing of *Satureja calamintha* species is probably due to the presence of hydroxyl group in the phenolic compounds that can serve as an electron donor. Aqueous extracts are then good antioxidants, indeed LAE of *P. halepensis* (Mill.) resin shows inhibition of 92.23±0.13% at a concentration of only 200 µg/mL.

β-carotene bleaching test

Based on the results of β-carotene bleaching assay of pine resin LAE (Fig. 2), the OD recorded at T=0min is higher than those recorded for other time intervals. The decrease in OD occured between 0 and 15 minutes and then became slower for the resin and BHT. The decrease in absorbance is however very marked for the aqueous and methanolic controls devoid of resin extract following the disappearance of the β-carotene, the oxidation of linoleic acid is at a maximum after 60 min. BHT appeared the most potent antioxidant; the LAE of *P. halepensis* resin also showed a remarkable and significant antioxidant effect by inhibiting β-carotene oxidation. **Neacsu *et al.* (2007)** isolated six knotwood flavonoids, two flavonoid glucosides and one cinnamic acid derivative from Jack pine and European aspen knotwood, all compounds inhibited lipid peroxidation and scavenge peroxyl radicals, their antioxidant properties are close to that of the reference compound Trolox. **Kouamé *et al.* (2009)** highlighted the radical scavenging activity of samples extracted from leaves richer in polyphenols and galls of *Guiera senegalensis* by measuring the inhibition of β-carotene oxidative degradation.

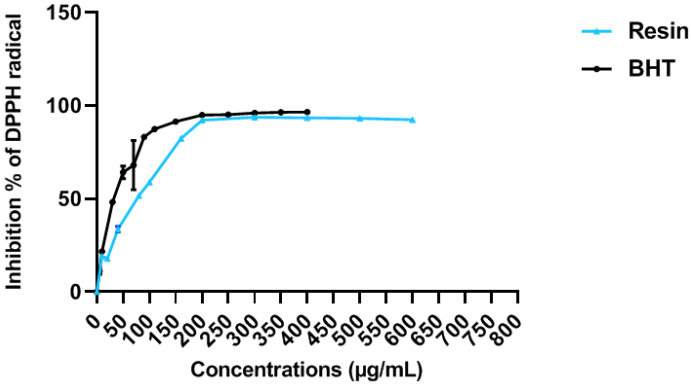


Figure 1 Scavenging effect percentage of DPPH free radicals by LAE (lyophilized aqueous extract) of *Pinus halepensis* (Mill.) resin and BHT (butylated hydroxytoluene; $p<0.05$).

Pycnogenol containing organic acids- cafeic, cinnamic, fumaric, gallic, vanillic, ferulic, and protacatechuic, extracted from French Maritime pine tree bark, (**Simpson *et al.*, 2019**), provided photoprotection, reduce hyperpigmentation of human skin and improveed skin barrier function and extracellular matrix homeostasis (**Grether-Beck *et al.*, 2016**). Several research studies have demonstrated the antioxidant potential of derivatives of the components of *Pinus* genus as proanthocyanidin, cinnamic acid and its derivatives. The tested LAE pine resin extract contained a relatively large fraction consisting of cinnamic acid derivatives which are more active antioxidants than those of benzoic acid derivatives (**Eom *et al.*, 2012**). According to **Ku *et al.* (2007),** hot water extracts from *Pinus densiflora*, *P. radiata* and *P. rigida* indicated greater antioxidant activity owing to high proanthocyanidin content. The same authors also suggest that *P. radiata* bark can be considered as a natural resource for biological and pharmaceutical applications why not the LAE resin; which was also obtained by hot water extraction. The present results showed also the presence of cafeic, vanillic, isoferulic and protocatechuic acids in *P. halepensis* resin LAE obtained by hot water that can be used as a potent radical scavenger and consequently as potent antioxidant.

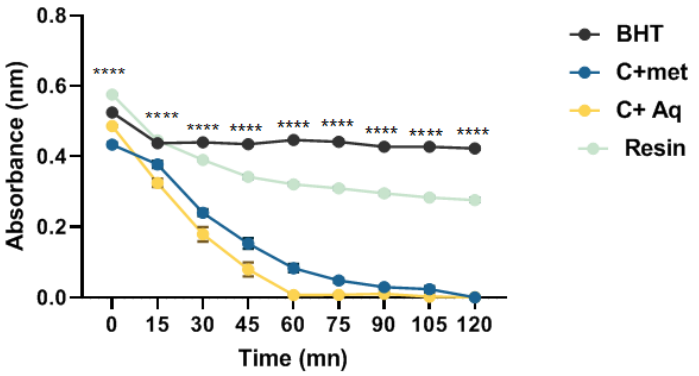


Figure 2 Antioxidant activity of *Pinus halepensis* (Mill.) resin lyophilized aqueous extract (resin), butylated hydroxytoluene (BHT), distilled water (c Aq) and methanol control (C Met) using β-carotene bleaching test ($p<0.05$).

Antifungal activity of *Pinus halepensis* (Mill.) resin LAE

P. halepensis (Mill.) LAE resin had different inhibitory effects on the tested fungi, depending on the fungi, the concentrations and the time of incubation. The most important effect is obtained with 100 µg/mL. The percent inhibition was of 58.9%; 58.44%; 41.36% and 34.43% against *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* respectively, Differences were highly significants (****, $p<0.05$; Fig. 3). When probits were plotted against Log_2 concentration of resin LAE samples, the relation was linear and the concentration required for 50% inhibition is 77 µg/mL for *T. tonsurans* and 78 µg/mL for *T. Rubrum* and *T. equinum*. *T. tonsurans* was the most sensitive to the extract and *T. mentagrophytes* was the most resistant one.

The antifungal activity of the pine resin aqueous extract may be related to its chemical composition. The pine resin aqueous extract contains some compound which has antifungal activity such as caffeic acid (**Chang *et al.*, 2011**) and thymol (**Falcone *et al.*, 2005**; **Guo *et al.*, 2009**; **de Lira Mota *et al.*, 2012**; **Dias de Castro *et al.*, 2015**).

In fact, caffeic acid strongly inhibited the growth of *Ganoderma boninense* at a concentration of 2.5mg/mL (**Chang *et al.*, 2011**). Thymol (THY) had *in vitro* antifungal activity against 24 fluconazole (FLC)-resistant and 12 FLC-susceptible clinical isolates of *Candida albicans* (**Guo *et al.*, 2009**) and against *C. albicans* and *C. krusei* with inhibitor concentrations (MIC) of 39 µg/mL and 78 µg/mL respectively (**Dias de Castro *et al.*, 2015**).

According to **de Oliveira Pereira *et al.* (2013)**, eugenol (contains phenolic group) inhibited *Trichophyton rubrum* strains with MICs from 64– 512 µg/mL. The obtained extract also contains a considerable amount of phenolic compounds which can be responsible for growth inhibition of the tested dermatophytic fungi.

Using the agar plate diffusion method, **Rautio *et al.* (2012)** found that resin purified from Norway spruce (*Piceaabies*) in salve mixture had antifungal activity against trichophytic fungi. These authors confirm that the salve with a resin concentration of 20% or more caused a significant fungicidal effect against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and *T. tonsurans*.

Increasingly, plant aqueous extracts are effective as significant and remarkable antifungal. **Schmourlo *et al.* (2005)** reported that lyophilized aqueous extracts of *Xanthosomas agittifolium*, according to popular use, inhibited the growth of *T. rubrum* strains isolated from clinical cases by an inhibition zone diameter of 18 mm with a lowest MIC of 100 ng/mL against *T. rubrum*.

Shams Ghahfarokhi *et al.* (2004) reported that AOE (aqueous onion extract), at different concentrations, inhibited significantly the growth of both *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* in a dose- and time-dependent manner compared with the controls. It was found that the AOE had fungistatic effect from 0.78% to 3.12 (v/v) and fungicidal properties at the range of 6.25to 50% (v/v) for both fungi at all culture periods.

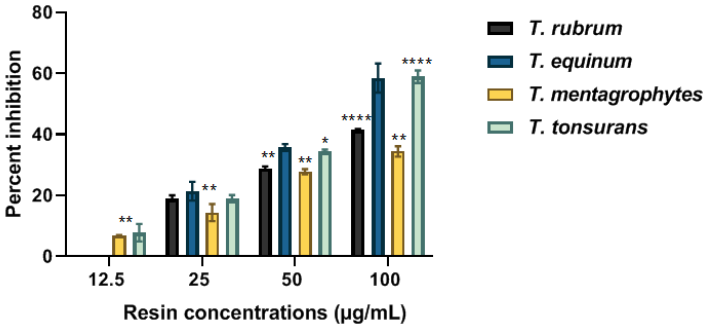


Figure 3 Growth inhibition percentages of tested dermatophytic fungi by lyophilized aqueous extract (LAE) of *Pinus halepensis* (Mill.) resin ($p<0.05$)

CONCLUSION

The results of this study showed that *Pinus halepensis* (Mill.) resin lyophilized aqueous extract has considerable anti-oxidant and antifungal activities *in vitro*. Also, it contains important amounts of phenolic compounds and can be used as natural source of antifungal and antioxidants valuable in food supplement. It is hoped that efforts will continue to discover natural active compounds derived from plants with potent therapeutic action devoid of toxicity. We should then maintain our efforts in protecting and valorizing our natural patrimony, as well as scientific research on *P. halepensis* (Mill.) resin from chemical analysis, biological, toxicological and pharmacological investigations to therapeutic aspects.

Acknowledgments: Authors would like to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria and the Directorate General for Scientific Research and Technological Development (DGRSDT) for the financial assistance. Project reference D01N01UN190120190003.

REFERENCES

Abbou, A., Kadri, N., Debbache, N., Dairi, S., Remini, H., Dahmoune, F., Berkani F., Adel, K., Belbahi, A. & Madani, K. (2019). Effect of precipitation solvent on some biological activities of polysaccharides from *Pinus halepensis* Mill. seeds. *International Journal of Biological Macromolecules, 141*, 663–670. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.266

Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F.Z., Lazzouni, H.A., Rebiahi, S.A., Ziani-Cherif, C. & Bessiere. (2011). Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research, 5(22)*, 5433-5436. https://doi.org/10.5897/JMPR.9000340

Benderradji, L., Rebbas, K., Ghadbane, M., Bounar, R., Brini, F. & Bouzerzour, H. (2014). Ethnobotanical study of medicinal plants in Djebel Messaad region (M'SILA, ALGERIA). *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine, 3(12)*, 445-459. https://search.proquest.com/docview/1644728445/fulltextPDF/77D7D628D1004B7DPQ/1

Bendif, H., Soulah, N., Miara M.M., Daoud, N., Benmiri, Y., Lazli, M., Khafha H. & Bahlouli F. (2020). Medicinal plants popularly used in the rural communities of Ben Srour (South East of M'Sila, Algeria). *AgroLife Scientific Journal, 9(2)*, 45-55. http://agrolifejournal.usamv.ro/pdf/vol.IX_2/vol9_2.pdf

Berroukche, A., Amara, S., Halimi, S. & Benyamina, F. (2014). Evaluation of the leave and bud decoctions *Pinus halepensis* Mill. effects on the induced-phenol renal toxicity in Wistar rats. *Journal of Fundamentals and Applied Sciences, 6(2)*, 197-207. http://jfas.info/psjfas/index.php/jfas/issue/view/27

Bouasla, A. & Bouasla, I., (2017). Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytomedicine, 36*, 68–81. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.007

Bougandoura, N. & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Revue «Nature & Technologie». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, 9, 14-19. (Frensh) https://www.univ-chlef.dz/revuenatec/Issue_09_Art_B_03.pdf

Chang, K.P., Rossal, S. & Atong, M. (2011). HPC fingerprints and *in vitro* antimicrobial activity of synergic acid, caggeic acid and 4-hydrobenzoic acid against *Ganodermaboninense*. *Journal of Applied Sciences, 11(13)*, 2284-2291. doi: 10.3923/jas.2011.2284.2291

Chelgham, I., Belkhelfa, S, Achachi, S., Aissaoui, I., & Mohamdi, N. (2012). Les mycoses superficielles: à propos des cas diagnostiques dans la région des Aures (Batna)/ Algérie de 2002 à 2011. *Journal de Mycologie Médicale, 22(1)*, 113. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.12.045

Chen, C.N., Wu, C.L. & Lin, J.K. (2004). Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells. *Biochemical Pharmacology, 67*, 53–66. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.07.020

Chermat, S. & Gharzouli, R. (2015). Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdimm (Setif). *Journal of Materials Science and Engineering, A 5 (1-2)*, 50-59. doi:10.17265/2161-6213/2015.1-2.007

Chohra, D. & Ferchichi, L. (2019). Ethnobotanical study of Belezma National Park (BNP) plants in Batna: East of Algeria. *Acta Scientifica Naturalis, 6*, 40–54. doi: https://doi.org/10.2478/asn-2019-0017

de Lira Mota; K.S., de Oliveira Pereira, F., de Oliveira, W.A., Oliveira Lima, I. & de Oliveira Lima, E. (2012). Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. *Molecules, 17*, 14418-14433. doi:10.3390/molecules171214418

Delmond, B. (2002). Résines naturelles. *Techniques de l'Ingénieur*, référence k340, 1–14. (Frensh)

de Oliveira Pereira, F., Mendes, J.M. & de Oliveira Lima, E. (2013). Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Medical Mycology, 51*, 507–513. doi: 10.3109/13693786.2012.742966

Dias de Castro, R., Murielly Pereira, T., de Souza, A., Dornelas Bezerra, L.M., Silva Ferreira, G.L., de Brito Costa, E.M.M. & Cavalcanti, A.L. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*, 417. doi:10.1186/s12906-015-0947-2

Dob, T., Berramdane, T. & Chelgoum, C. (2005). Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes rendus Chimie*, *8*, 1939–1945. https://doi.org/10.1016/j.crci.2005.05.007

El Omari, N., Ezzahrae Guaouguaou, F., El Menyiy, N., Benali, T., Aanniz,T., Chamkhi, I., Balahbib, A., Taha, D., Shariati, M.A., Ghokhan, Z., El-Shazly, M. & Bouyahya, A. (2021). Phytochemical and biological activities of *Pinus halepensis* Mill. and their ethnomedicinal use. *Journal of Ethnopharmacology*, *268*, 113661. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113661.

Ennaghra, N., Meddour A., Soumati, B. & Kabouchi-Bouzidi, L. (2016). Epidemiological Survey on the Dermatophyte Flora in the Area of Annaba East of Algeria. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, *6(12)*, 8-15. https://www.textroad.com/JAEBS-December,%202016.html

Eom, T.K., Senevirathne, M. & Kim, S.K. (2012). Synthesis of phenolic acid conjugated chitooligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity. *Environmental toxicology and pharmacology*, *34*, 519–527. https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.004

Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M.A., Corbo, M.R. & Sinigaglia, M. (2005). A Study on the Antimicrobial Activity of Thymol Intended as a Natural Preservative. *Journal of Food Protection*, *68(8)*, 1664–1670. https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.8.1664

Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B. & Costa, J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4(2)*, 97-103. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60323-6

Finney, D.J. (1971). Probit analysis. 3rd Edition, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 333 pp.

García-Pérez, M.E., Royerb, M., Duque-Fernandez, A., Diouf, P.N., Stevanovic, T. & Pouliot, R. (2010). Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, *132*, 251–258. doi: 10.1016/j.jep.2010.08.030

Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch. A., Aafi, A., El Abid, A., Ismaili, M.R. & Farah A. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, *154(2)*, 293-300. (Frensh) doi:http://dx.doi.org/10.1080/12538078.2007.10516058

Grether-Beck, S., Marini, A., Jaenicke, T., & Krutmann, J. (2016) French Maritime Pine Bark Extract (Pycnogel®) Effects on Human skin: Clinical and Molecular Evidence. *Skin Pharmacology and Physiology*. *29*, 13-17. https://doi.org/10.1159/000441039

Gülçin, I., Elmastat, M. & Aboul-Enein, H.Y. (2007). Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimumbasilicum L.* Family *Lamiaceae*) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, *21*, 354–361. https://doi.org/10.1002/ptr.2069

Guo, N., Liu, J., Wu, X., Bi, X., Meng, R., Wang, X., Xiang, H., Deng, X. & Yu, L. (2009). Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, *58*, 1074–1079. doi 10.1099/jmm.0.008052-0 0

Haichour, R., Ramdani, M., Lograda, T., Chalard, P. & Figueredo, G. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of *Pinus halepensis* from Algeria. *BIODIVERSITAS*, *21(9)*, 4345-4360. . https://smujo.id/biodiv/article/view/6519

Hammadi, K., Selselet, A.G. & Bensoltane, S.A. (2007). Dermatophytes in North West of Algeria a Prospective Study. *Middle-East Journal of Scientific Research, 2 (3-4)*, 104-106. http://www.idosi.org/mejsr/mejsr2(3-4)/3.pdf

Ignat, I., Volf, I. & Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, *126*, 1821–1835. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026

Ilham, A. & Touabti, A (2013). Les onychomycoses au laboratoire de parasitologie CHU Sétif: étude sur dix ans. *Journal de Mycologie Médicale*, 23(1), 81-82. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.12.036

Kaouachi, A. & Derouiche, S. (2018). Phytochemical analysis, DPPH antioxidant activity and acute toxicity of bark aqueous extracts of *Pinus halepensis*. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*, *6 (3)*, 86-91. http://www.aelsindia.com/rjcesjune2018/14.pdf

Karepova, Z.A., Repyak, S.M. & Levdikova, V.L. (1983). Acids of an aqueous extract of the woody verdure of the pine *Pinus sylvestris*. *Chemistry of Natural Compounds*, *19(3)*, 362-363. https://doi.org/10.1007/BF00579780

Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I.P., Simporé, J. & Nikiéma, J.B. (2009). Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (*Combretacae*). *Science et technique, Sciences de la santé, 32(s 1 et 2)*, 9-23. https://www.ajol.info/index.php/stss/issue/archive

Krishnaiah, D., Sarbatly, R. & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, *89*, 217–233. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008

Ku, C.S., Jang, J.P. & Mun, S.P. (2007). Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *Journal of Wood Science*, *53*, 524–528. doi https://doi.org/10.1007/s10086-007-0896-6

Kumar, P. (2009). Green healers: A Review. In P. C. Trivedi (dir.), *Medicinal Plants, Utilisation and Conservation*. (2nd Revised and Enlarged Edition, Aavishkar Publishers, Distributors, pp. 95-103). Jaipur 302 003 (Raj) India.

Malik, C.P., Garg, P., Singh, Y. & Grover, S. (2012). Medicinal uses, chemical constituents and micro propagation of three potential medicinal plants. *International Journal of Life science and Pharma Research*, *2(3)*, 57-76. https://www.ijlpr.com/archive-issue.php?issueid=4

Mansouri, N., Satrani, B., Ghanmi, M., El Ghadraoui, L., Guedira, A. & Aafi, A. (2011). Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Juniperus communis* du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 80*, 791 – 805. https://popups.uliege.be:443/0037-9565/index.php?id=3340

Meddour R. & Meddour-Sahar O. (2015). Medicinal plants and their traditional uses in Kabylia (Tizi Ouzou, Algeria). *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *1(2)*, 137-151. https://revues.imist.ma/index.php/AJMAP/article/view/4331

Meziti, H., Bouriche, H., Kada, S., Demirtas, I., Kizil, M. & Senator, A. (2019). Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects of *Quercus ilex.* and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, *7 (4)*, 260-272. https://jppres.com/jppres/quercus-ilex-and-pinus-halepensis-biological-effects/

Miara, M.D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M.A. & Maggi, F. (2019). Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, *16*, 100262. https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100262

Nahal, I. (1962). Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). (1962). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences*. Publication trimestrielle, tome XIX - fascicule *4-48* trimestre 1962. Nancy, Ecole Nationale Des Eaux Et Forêts.

Neacsu, M., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Pietarinen, S.P., Ahotupa, M.O., Holmbom, B.R., & Willför, S.M. (2007). Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *Holz als Roh- und Werkstoff*, *65*, 1–6. doi: https://doi.org/10.1007/s00107-006-0121-0

Que, F., Mao, L. & Pan, X. (2006). Antioxidant activities of five Chines rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, *39*, 581-587. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.12.001

Rautio, M., Sipponen, A., Lohi, J., Lounatmaa, K., Koukila-Kähkölä, P. & Laitinen, K. (2012). *In vitro* fungistatic effects of natural coniferous resin from Norway spruce (*Piceaabies*). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *31*, 1783–1789. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1502-9

Rebbas K., Bounar R., Gharzouli R., Ramdani M., Djellouli Y. & Alatou, D. (2012). Plantes d'intérêt médicinal et écologique dans la région d'Ouanougha (M'sila, Algérie). *Phytothérapie 10(2)*, 131–142. https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=25900129

Sarri, M., Sarri, D., Hendel, N., & Boudjelal, A. (2012). Ethnobotanical study of therapeutic plants used to treat arterial hypertension in the Hodna region of Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, *1(9)*, 411-417. https://www.researchgate.net/publication/283904425_Ethnobotanical_study_of_therapeutic_plants_used_to_treat_arterial_hypertension_in_the_Hodna_region_of_Algeria

Sarri, M., Boudjelal, A., Hendel, N., Sarri, D. & Benkhaled, A. (2015). Flora and ethnobotany of medicinal plants in the southeast of the capital of Hodna (Algeria). *Arabian Journal of Medicinal & Aromatic Plants*, *1(1)*, 24-30. https://revues.imist.ma/index.php/AJMAP/article/view/3255/2349

Schmourlo, G., Mendonc, R.R., Filho, A., Alviano, C.S. & Costa, S.S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *96*, 563–568. https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.007

Senouci, F., Ababou, A., Chouieb, M. & Chouieb, M. (2019). Ethnobotanical Survey of the Medicinal Plants used in the Southern Mediterranean. Case Study: The Region of Bissa (Northeastern Dahra Mountains, Algeria). *Pharmacognosy Journal*, *11*, 647–659. https://doi:10.5530/pj.2019.11.103

Shams Ghahfarokhi, M., Goodarzi, M., Razzaghi Abyaneh, M., Al-Tiraihi, T. & Seyedipour G. (2004) Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, *75*, 645– 655. doi: 10.1016/j.fitote.2004.06.009

Simard, F. (2007). *Évaluation du potentiel anticancéreux des extractibles du bois de pin rouge*. Maîtrise en ressources renouvelables, Université du Quebec.

Simpson, T., Kure, C., & Stough, C. (2019). Assessing the Efficacy and Mechanisms of Pycnogenol® on Cognitive Aging From *In Vitro* Animal and Human Studies. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 694. doi:https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00694

Sipponen, A. **(**2013). Coniferous resin salve, ancient and effective treatment for chronic wounds – Doctoral dissertation (article-based), Helsinki University Hospital, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
Soltani, E., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Angeles Esteban, M. & Zerroug, M.M. (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellf Immunology*, *62*, 57-67. http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.009
Sun, T., & Ho, C.T. **(**2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, *90*, 743–749. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.035
Trapp, S., & Croteau, R. (2001). Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual Review of Plant Biology*, *52*, 689–724. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.689
Walia, A., Gupta, A.K. & Sharma, V. (2019). Role of Bioactive Compounds in Human Health". *Acta Scientific Medical Sciences 3(9)*, 25-33. https://www.actascientific.com/ASMS-3-9.php#popup1
Wojdyło, A, Oszmiański, J, & Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, *105*, 940–949. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038

ملخص

يعتبر استخدام النباتات للتخفيف في معالجة الأمراض والتخفيف من معاناة الإنسان قديمًا قدم البشر. يحتل استعمال صمغ الصنوبر الحلبي مكانة هامة في الطب الشعبي الجزائري، حيث يستخدم كمضاد بكتيري ومضاد التهاب ومطهر، إضافة إلى استعماله في علاج أمراض الجهاز التنفسي والجهاز البولي. اهتمت الدراسة بتحديد المكونات الرئيسية للمستخلص المائي المجفد للصمغ بواسطة GC/MS، ثم دراسة قدرته المضادة للأكسدة ونشاطه ضد مكروبي بصفة أساسية ضد الاتصالات الخلوية (antiquorum sensing) ونشاطه ضد فطري تجاه الفطريات الجلدية. بين تحليل التركيب الكيميائي بواسطة GC / MS أن للمستخلص المائي المجفد (EALRP) يحتوي على مركبات عطرية بنسبة 64.52٪. كان حمض الـ cinnamic والسكريات والسكريات الكحولية والقلويدات ومركبات أخرى بنسب مختلفة 0.85٪ و6.45٪ و0.87٪ و2.05٪ على الترتيب. أظهر اختبار النشاطية ضد التأكسدية قدرة كبيرة للمستخلص على إزاحة الجذور الحرة باستخدام اختبـــار DPPH، حيث فاقت نسبة التثبيط 90٪ عند التركيزين 150 ميكروغرام/مل و200 ميكروغرام/مل لكل من EALRP وBHT على الترتيب. كما سجلت مـــع تسجيل تركيز مثبيط لـ 50٪ (IC50) مقدر بـ 45.11 ميكـروغرام/مـــل عند استعمـــــال β-carotene. بين اختبار النشاطية ضد مكروبية قدرة المستخلص على كبح التواصل الخلوي وتثبيط تشكيل عند البكتريا الممرضة مع حماية ماية *Artemia* ضد البكتريا الممرضة سالبة الجرام *Vibrio harveyi* BB120 . كما بين الاختبار نشاطية ضد فطرية هامة حيث ارتفعت نسبة تثبيط الفطريات الجلدية مع ارتفاع تركيز المستخلص وفترة الحضن.

كلمات مفتاحية: نشاطية ضد تأكسدية، نشاطية ضد ميكروبية، anti QS، GC/MS، *Pinus halepensis*، صمغ.

Résumé

L'utilisation de plantes pour atténuer la souffrance humaine est peut-être aussi vieille que l'homme. En médecine traditionnelle algérienne, la résine de *Pinus halepensis* est utilisée comme antimicrobien, anti-inflammatoire, analgésique, cicatrisant, pour le traitement des maladies respiratoires et urinaires, ...etc. Dans la présente étude, l'extrait aqueux lyophilisé (EALRP) de résine de *Pinus halepensis* Mill. a été soumis à une analyse pour déterminer sa composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). L'activité antioxydante est évaluée *in vitro* à l'aide du 2,2-diphényle-b, picrylhydrazyle (DPPH) et le blanchiment du β-carotène. Ensuite les capacités antimicrobiennes ont été recherchées. Une évaluation antibactérienne par la mise en évidence du pouvoir antiquorum sensing de cet extrait. En plus d'une évaluation de l'activité antifongique a été menée, plus précisément anti dermatophyte. Les résultats ont montré que l'EALRP contenait 64,57 % de composés aromatiques, l'acide succinique, des sucres et des sucres alcooliques, des alcaloïdes et d'autres composés qui représentent respectivement 0,58%, 6,45%, 0,87% et 2,05%. Les résultats de piégeage des radicaux libres ont montré que l'EALRP possédait une capacité assez significative de piégeage des radicaux libres en utilisant le test DPPH, l'inhibition était supérieur à 90% à seulement 150 et 200 µg / ml respectivement pour le BHT et l'EALRP. Une bonne activité antioxydante en utilisant le test du β-carotène a aussi été démontrée. Outre ses capacités anti QS par la dégradation et l'inhibition des signaux de communications, l'EALRP a significativement inhibé la formation de Biofilm chez des bactéries responsables d'infections nosocomiales et a protégé *Artémia* contre *Vibrio harveyi* BB120. Son activité antifongique a aussi été importante où les pourcentages d'inhibitions augmentaient avec le temps d'incubation et la concentration utilisée.

Mots clés : activité antioxydante, anti QS, activité anti microbienne, GC/MS, *Pinus halepensis*, résine.

Summary

The use of plants to alleviate human suffering may be as old as humans. In traditional Algerian medicine, *Pinus halepensis* resin is used as an antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic, healing agent, for the treatment of respiratory and urinary diseases, etc. In the present study, the *Pinus halepensis* Mill. resin lyophilized aqueous extract (EALRP) was analyzed for its chemical composition by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). The antioxidant activity is evaluated *in vitro* using 2,2-diphenyl-b, picrylhydrazyl (DPPH) and the bleaching of β-carotene. Then the antimicrobial was tested and focused on the antiquorum sensing power and antidermatophytic activity. The results showed that the EALRP contained 64.57% aromatic compounds. Succinic acid, sugars, alcoholic sugars, alkaloids and other compounds respectively represent 0.58%, 6.45%, 0.87% and 2.05%. The free radical scavenging results showed that the EALRP possessed a fairly significant free radical scavenging capacity using the DPPH test, the inhibition was greater than 90% at only 150 and 200 µg / ml respectively for BHT and EALRP. Good antioxidant activity using the β-carotene test has also been demonstrated. In addition to its anti-QS capabilities through degradation and inhibition of communications signals, EALRP significantly inhibited Biofilm formation in bacteria responsible for nosocomial infections and protected *Artemia* against *Vibrio harveyi* BB120. Its antifungal activity was also important where the percentages of inhibitions increased with the incubation time and the concentration used.

Keywords: antioxidant activity, anti QS, anti-microbial activity, GC/MS, *Pinus halepensis*, resin.