

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire des substances naturelles et bioactives

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Option : **Molécules Bioactives : Synthèses et Applications**

Présenté par : **Melle SELADJI Dalila**

Titre

**COMPOSITIONS CHIMIQUES, PROPRIETES ANTIMICROBIENNES ET
ANTIOXYDANTES DES HUILES ESSENTIELLES DES RACINES DE
TROIS *PINACEAE* D'ALGERIE**

Présidents	Saïd Ghalem/Boufeldja Tabti	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs :	Mourad Bendahou	Professeur	Université de Tlemcen
	Mohammed El Amine Dib	MCA	Université de Tlemcen
	Meriem Merad	MCA	Université de Tlemcen
	Nouria Merad	MCA	Université de Tlemcen
	Nassim Djabou	MCA	Université de Tlemcen
Directeur de mémoire	Hocine Allali	Professeur	Université de Tlemcen

Le 29 Mai 2014

DEDICACE

A mes parents

A mon frère et mes sœurs,

A ma famille,

A mes ami(e)s

*Enfin à toutes les personnes qui ont contribué de près
ou de loin à accomplir ce modeste mémoire.*

-REMERCIEMENTS-

.....

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donné pour mener ce travail à terme.

Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements au Pr. Allali H. qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Je ne peux, Monsieur, que sincèrement vous exprimer mon respect et mon gratitude.

Je tiens à remercier Pr. Ghalem S et Pr. Tabti B. d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

Je tiens à remercier Pr. Bendahou M., Dr Merad.N., Dr Merad.M., Dr Dib M.A et Dr Dajbou.N Maitres de conférences à l'université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon travail.

Monsieur le Pr D B.BENABADJI à l'université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen.

Madame F.NADIA Doctorante au laboratoire LASNABIO pour ces précieux conseils, son aide et son encouragement tout le long de mon parcours pour la réalisation de ce mémoire.

Le LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE A L'AGROALIMENTAIRE, AU BIOMEDICAL ET L'ENVIRONNEMENT. Madame H.Hassaine et ces étudiantes pour leur aide précieuse dans la réalisation des tests d'activité antimicrobienne.

Enfin mes vifs remerciements à tous les chercheurs de laboratoires LASNABIO.

Résumé

Les compositions chimiques des huiles essentielles isolées à partir des racines de *Pinus halepensis*, *P. pinaster* et *P. pinea* poussant en Algérie, ont été étudiées par CPG et CPG/SM. L'huile de *P. halepensis* s'est révélée être riches en monoterpènes hydrocarbonés (93,2%), avec α -pinène (87,4%) comme constituant majoritaire. Les composés les plus abondants dans l'huile *P. pinaster* sont α -pinène (22,0%), β -pinène (27,1%) et trans-*p*-caryophyllène (21,4%), tandis que l'huile de *P. pinea* contient limonène (66,3%), constituant majoritaire. Les huiles ont été testées pour leur effet inhibiteur sur les bactéries et les champignons. L'examen de l'activité antimicrobienne a révélé que les huiles de *P. pinaster* présentaient une activité définie contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. De plus, les activités antioxydantes, déterminées par deux méthodes: DPPH & FRAP, ont montré que les huiles essentielles ont des potentiels antioxydants modérés, comparés à d'autres espèces de *Pinus* cités dans la littérature.

Mots clés: *Pinaceae*; *Pinus halepensis*; *Pinus pinea*; *Pinus pinaster*; Huiles Essentielles; Activité Antibactérienne; Activité Antioxydante

Abstract

The composition of the essential oils isolated from the roots of *Pinus halepensis*, *P. pinaster*, and *P. pinea* grown in Algeria were investigated by GC and GC/MS. The oil of *P. halepensis* was found to be rich in monoterpenes hydrocarbons (93.2 %), with α -pinene (87.4 %) being the major component. The most abundant compounds in *P. pinaster* oil were α -pinene (22.0 %), β -pinene (27.1 %) and trans-*p*-caryophyllene (21.4 %), while the oil of *P. pinea* contained limonene (66.3%) as a major component. The oils were tested for their inhibitory effect against bacteria and fungi. Examination of the antimicrobial activity revealed that *P. pinaster* oils exhibited a definite activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The antioxidant activity determined by two methods: DPPH radical scavenging test and ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay showed that the essential oils have a moderate antioxidant potential, compared to others species of *Pinus* in the literature.

Keywords: *Pinaceae*; *Pinus halepensis*; *Pinus pinea*; *Pinus pinaster*; Essential oils; Antibacterial activity; Antioxidant activity

ملخص

قد تم التحقيق في التركيب الكيميائي للزيوت العطرية المعزولة من جذور *P. pinaster*، *P. halepensis* و *P. pinea* في الجزائر عن طريق GC و GC/MS. تم العثور على زيت من *P. halepensis* غنية من أحادي تربين الهيدروكربونات (93.2 %)، مع α -بينين (87.4 %) كونها عنصرا رئيسيا. كانت المركبات الأكثر وفرة في زيت *P. pinaster* α -بينين (22.0 %)، β -بينين (27.1 %) و كريفلان (21.4 %)، في حين أن الزيت الواردة من *P. pinea* غنية من الليمونين (66.3 %). تم اختبار الزيوت لتأثير كايح ضد البكتيريا والفطريات. كشفت دراسة النشاط البكتيري أن زيوت *P. pinaster* أظهرت نشاط واضح ضد المكورات العنقودية الذهبية و العسوية الشمعية. النشاط المضاد للأكسدة التي تحدها طريقتين : DPPH و FRAP الفحص أظهر أن الزيوت الأساسية لديها إمكانات المضادة للأكسدة معتدلة، مقارنة مع الأنواع الأخرى من الصنوبر.

الكلمات الرئيسية: *Pinaceae*; *P. halepensis*; *P. pinea*; *P. pinaster*; الزيوت الأساسية؛ النشاط المضاد للبكتيريا؛ النشاط المضادة للأكسدة

TABLES DES MATIERES

Dédicace.....	I	5-1- Les méthodes conventionnelles.....	16
Remerciements.....	II	Entraînement à la vapeur.....	16
Résumé.....	III	Hydrodistillation simple.....	16
Table des matières.....	IV	Expression à froid.....	16
Introduction générale.....	1	Extraction par solvant.....	16
PREMIERE PARTIE		Extraction par Soxhlet.....	16
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE		Enfleurage.....	17
CHAPITRE I		5-2- Les méthodes nouvelles.....	17
ETUDE BOTANIQUE		Extraction par CO ₂ supercritique.....	17
1-Introduction.....	4	Extraction assistée par micro-ondes.....	17
2-Répartition géographique.....	4	6-Utilisations des H.E.....	18
3-Description botanique.....	6	7-Toxicologie.....	18
4-Taxonomie.....	7	Bibliographie.....	19
5-Appellations locales.....	7	DEUXIEME PARTIE	
6-Utilisations traditionnelles.....	7	ESSAIS EXPERIMENTAUX	
7-Travaux antérieurs.....	7	CHAPITRE III	
A- <i>Pinus pinea</i>	7	EXTRACTION ET CARACTERISATION DES	
1-Etude chimique.....	7	HUILES ESSENTIELLES DES <i>PINUS</i>	
1-1 Composés phénoliques-acides gras.....	7	I-Extraction de l'H.E de <i>Pinus pinea</i> , <i>pinaster</i> et	
1-2 Huiles essentielles.....	8	<i>halepensis</i>	
2-Etude biologique.....	8	1-Introduction.....	20
B- <i>Pinus pinaster</i>	8	2- Cueillette de la matière végétale.....	20
1-Etude chimique.....	8	3-Extraction des huiles essentielles.....	20
1-1 Flavonoïdes.....	8	3.1-Hydrodistillation.....	20
1-2 Huiles essentielles.....	9	4-Calcul du rendement.....	21
2-Etude biologique.....	9	II- Caractérisation des huiles essentielles des trois <i>Pinus</i>	22
C- <i>Pinus halepensis</i>	9	1-Analyse chimique des H.E.....	22
1-Etude chimique.....	9	1.1-Analyse par CPG.....	22
1-2 Huiles essentielles.....	9	1.2-Analyse par CPG/SM.....	23
2-Etude biologique.....	10	III-Composition chimique des trois <i>Pinus</i>	23
2-1 Activité antimicrobienne.....	10	Résultats & Discussion.....	25
2-2 Activité antifongique.....	10	Bibliographie.....	28
8-Bibliographie.....	11	28
.....	12	CHAPITRE IV	
CHAPITRE II		ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES	
LES HUILES ESSENTIELLES		ESSENTIELLES DES <i>PINUS</i>	
1-Introduction.....	13	I-Activité antimicrobienne.....	29
2-Définition.....	13	1-Introduction.....	29
3-Composés chimique.....	13	2-Définition d'un antimicrobien.....	29
4-Propriétés physico-chimiques des H.E.....	15	3-Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	29
5-Modes d'extraction des H.E.....	16	3-1-Méthode de diffusion des disques sur milieu solide... ..	29
4-Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	33	3-2-Méthode de dilution en milieu liquide.....	30
4-1 -Test de réduction du radical stable, le DPPH°.....	33	4-Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des	30
4-1-1-Expression des résultats.....	33	levures.....	30
4-2-1-Résultats et Discussion.....	35	4.1-Discussion des résultats.....	32
4-2- Réduction du Fer : FRAP.....	36	II-Activité anti-oxydante.....	32
4-2-1 Interprétation des résultats.....	36	1-Introduction.....	32
5-Conclusion.....	36	2-Définition.....	32
Bibliographie.....	37	3-méthodes d'évaluation des propriétés anti-oxydantes in	33
.....	39	vitro.....	33
		3-1 Test de β-carotène.....	33
		3-2-Test Rancimat.....	33

|

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes ont été de tout temps les alliées de l'homme, d'abord pour se nourrir et aussi pour soulager ses maux. On sait que les plantes constituaient la base de la pharmacopée et de la thérapeutique des civilisations antiques [1].

En Afrique comme un peu partout dans le monde, plus que la moitié de la population a recours à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales pour ses soins de santé primaires à cause du coût élevé des médicaments et leurs indisponibilités sur le marché ainsi la déception face aux médicaments prescrits et aux traitements conventionnels [2].

La médecine traditionnelle ou la phytothérapie réunit l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques ou mentales [3].

Au XIXe siècle la phytothérapie prit un tournant décisif avec la naissance de la chimie extractive qui donna à cette discipline un caractère scientifique beaucoup plus marqué. Dans les mêmes temps, la naissance et le fulgurant développement de la chimie de synthèse ont concurrencé les médecines naturelles [4].

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leurs résistent de plus en plus [5].

La phytothérapie entrain dans une phase de régression et de désaffection car la chimie organique présentaient un double tranchant : d'un côté on se donnait la possibilité d'étudier avec précision des molécules naturelles très efficaces en médecine et en cosmétologie ; d'une autre, on parvenait à copier ces molécules en laboratoire et surtout à les remplacer par des composés des synthèses complètement différents, pharmacologiquement très actif et parfois moins chers [6].

C'est ainsi qu'une science a vu le jour : « l'aromathérapie » qui devrait, en général, être considérée comme un traitement d'appoint et non comme un traitement de substitution aux soins. C'est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques, qui repose sur la relation existant entre les composants chimiques des huiles essentielles et les activités thérapeutiques qui en découlent [7].

Une huile essentielle est l'âme de la plante aromatique. C'est l'essence volatile extraite de plantes aromatiques par la distillation. Il s'agit d'une substance complexe qui contient des molécules aromatiques dont l'action bénéfique sur la santé est étudiée et mise en pratique par l'aromathérapie [8].

Les plantes aromatiques ont longtemps fait partie des cultures algériennes et leurs utilisations sont très répandus dans la plupart des populations rurales [9].

Les plantes produisent une grande variété de métabolites secondaires: tels que les vitamines, terpènes, tanins, flavonoïdes, alcaloïdes et d'autres métabolites secondaires, qui sont souvent dotées d'activités antimicrobiennes et anti-oxydantes intéressantes [10]. La littérature révèle que beaucoup plantes aromatiques et médicinales sont testées pour leurs activités anti-oxydantes et antimicrobiennes. Cependant, il y en a d'autres, qui sont moins ou pas encore totalement examiné [11].

Dans ce travail, nous nous sommes penchés sur l'étude de l'activité antimicrobienne et anti-oxydante des huiles essentielles des racines des trois *Pinus*. Dans ce contexte s'inscrira notre projet de master. Pour cela, nous avons fixés comme objectifs à atteindre:

- ❖ La récolte des racines de *Pinus pinea*, *pinaster* et *halepensis* dans de la région de Tlemcen.
- ❖ Caractérisation botanique de *Pinus pinea*, *pinaster* et *halpensis*.
- ❖ Préparation de la matière végétale.
- ❖ Extraction des huiles essentielles des racines par hydrodistillation.
- ❖ Caractérisation chimique de l'huile essentielle par les méthodes chromatographiques CPG et CPG/SM.
- ❖ Mesure de l'activité biologique anti-oxydante et antibactérienne.

Pour atteindre ces objectifs les laboratoires, cités ci-dessous, ont apporté leurs contributions :

- ❖ Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (**LASNABIO**) - Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.
- ❖ Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (**CPN**) - Université de Corse, France.
- ❖ Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et l'Environnement (**MAABE**), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers (SNVSTU), Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.

Ce mémoire est réalisé en deux parties :

- Une première partie consiste en une étude bibliographique sur la description botanique de *Pinus pinea*, *pinaster* et *halepensis*, et les travaux dont ils ont fait l'objet d'étude.

- La deuxième partie consiste à l'étude expérimentale des trois plantes. Au cours de cette partie, nous visons l'extraction des huiles essentielles des trois *Pinus*. Cette étape est suivie par l'analyse et la caractérisation de l'huile essentielle par CPG et CPG/SM.

Enfin, nous avons déterminé l'activité anti-oxydante et antimicrobienne des huiles extraites.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Aiache J-M., Carnat A-P., Coudert P., Teulade J-C. Sources Actuelles et Futures du Médicament - Chimie du Médicament, *Elsevier Masson*, **2011**, p. 14.
- [2] Roulier G., Les Huiles Essentielles pour Votre Santé, Traité Pratique d'Aromathérapie : Propriétés et Indications Thérapeutiques des Essences de Plantes. Edition Dangles. France, **1992**, p. 6, 7.
- [3] Camara M. DEA de Phytothérapie & Médecine Traditionnelle, **2011**, p.5.
- [4] Chaumont J-P., Phyto-aromathérapie Appliquée à la Dermatologie, Lavoisier, **2011**, p. 13, 14.
- [5] Larousse, Encyclopédie des Plantes Médicinales: Identification, Préparation, Soins, **2001**, p. 9, 10.
- [6] Roux D., Conseil en Aromathérapie, 2^{ème} Edition, pro-officina, **2008**.
- [7] Emst E., Pittler M.H., Médecines alternatives: le guide critique, Ed. *Elsevier Masson*, **2005**, p. 36.
- [8] Zhiri A., Science, Nutrition, Prévention & Santé, Nutra news, **2006**, p. 2.
- [9] Quèzel P., Santa S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol 2, Edition CNRS. Paris, **1963**, p. 978.
- [10] Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W., Chen F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry* **2006**; 97: 705-711.
- [11] Chikhi I., Allali H., Dib M.A., Halla N., Muselli A., Tabti B., Costa J. Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of *Iris planifolia* (Mill.) from Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research* **2012**; 6(10): 1961-1968.

CHAPITRE I: ETUDE BOTANIQUE DES *PINUS* ET TRAVAUX ANTERIEURS

I-Etude botanique :

1-Introduction :

Les *Pinus* appartiennent à la famille des *pinaceae*, répartie dans le monde entier et essentiellement autour des côtes méditerranéennes [1]. Ce sont des arbres ou plus rarement des arbustes persistants, monoïques, aux rameaux régulièrement verticillés, ont des feuilles en forme d'aiguilles qui sont persistantes [2,3]. Les pinacées sont des conifères c'est-à-dire des plantes portant des cônes [1]. Le bois est recherché tant pour les usages industriels et aussi médicaux [3].

Cette famille compte 220 à 250 espèces réparties en 11 genres (*Abies*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudolarix*, *Peudotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Ketelaria*, *Nothotsuga*) [3]. En Algérie, on trouve trois genres qui sont [4]:

- Genre *abies* (le sapin) ;
- Genre *cerdus* (le cèdre) ;
- Genre *pinus* (les pins).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés de près à trois plantes de l'Algérie et plus précisément à Tlemcen qui sont : *Pinus halepensis*, *Pinus pinea* et *Pinus pinaster*.

2-Répartition géographique :

Le genre *Pinus* se répartie dans le monde. Nous le trouvons dans des régions assez variées et essentiellement autour des côtes méditerranéennes, plus particulièrement en Afrique du nord et en Espagne. En Algérie, les *Pinus* font partis de la richesse floristique à cause de la nature du climat et du sol qui s'y prête bien. En effet, ils aiment les zones à climat tempéré-froid de l'hémisphère septentrional, où ils occupent tous les étages de végétation, du niveau de la mer jusqu'à la limite supérieure des forêts, même en terrain en permanence gelé [5].



Figure1 : Aire de répartition naturelle des *Pinus*.

3-Description botanique :

Tableau 1 : Description botanique des trois *Pinus* étudiés.

	Arbres	Feuilles	Fruits
<i>P. pinea</i> [6]	 <p>Ces arbres atteignent la hauteur normale de 12-20 m, mais à certains moments, ils peuvent dépasser 25 m.</p>	 <p>Les feuilles de milieu-vert flexibles sont en forme d'aiguille, en paquets de deux, et sont de 10-20 cm.</p>	 <p>Les cônes sont larges ovoïdes, 8-15 cm de long.</p>
<i>P. pinaster</i> [7]	 <p>C'est un résineux au fût flexueux qui peut dépasser 20 m de hauteur avec une cime étalée et peu compacte.</p>	 <p>Les aiguilles groupées par deux, sont vertes foncé et très longues (10 à 20 cm).</p>	 <p>Les fruits, apparaissent précocement, entre 5 et 8 ans, pour former des cônes volumineux (10 à 18cm) bruns luisants qui contiennent des graines ailées.</p>
<i>P. halepensis</i> [8]	 <p>Arbre d'environ 20-30m souvent penché et peu droit, la cime est assez écrasée, irrégulière et claire.</p>	 <p>Les feuilles sont des aiguilles par deux, fines, aiguës souples, de 6 à 10 cm, vert grisâtre, appliquées le long des pousses et surtout groupées en pinceaux à l'extrémité des rameaux.</p>	 <p>Ils sont gros de 6 à 12 cm souvent isolés, brun clair luisant, écussons aplati Graines gris-noir moyennes.</p>

4-Taxonomie :

Le genre *Pinus* contient plus d'espèces que n'importe quel autre genre du groupe des conifères. Le sous-genre des *Pinus* (*Diploxylon*) est lui-même subdivisé en sections et sous-sections [9]:

Tableau 2 : Positon taxonomique des *Pinus*.

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Spermaphytes (Phanérogames)
Sous-embranchement	Gymnospermes
Classe	Pinopsida
Ordre	<i>Pinale</i>
Famille	<i>Pinaceae</i>
Sous-famille	<i>Pinoidée</i>
Genre	<i>Pinus</i>
Sous-genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis, pinea, pinaster</i>

5-Appellations locales :

Les *Pinus* sont connus localement sous le nom vernaculaire de : Senouber (الصنوبر) [10].

6-Utilisations traditionnelles :

Les *Pinus* sont utilisés en médecine traditionnelle algérienne. Ils sont le plus souvent utilisés comme :

- ✓ Antiseptique puissant à action dynamisante; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires [10].
- ✓ Rubéfiant et balsamique, efficace dans les affections pulmonaires: la grippe, la sinusite, les rhumatismes [10].

II-Travaux antérieurs :

A-*Pinus pinea* :

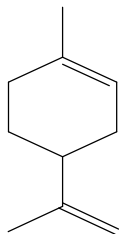
1-Etude chimique :

1-1-Composés phénoliques & acides gras :

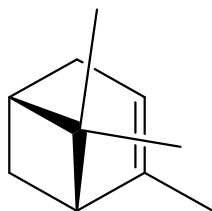
Les compositions des graines de *P. pinea* en teneur en vitamines et en acide gras ont été étudiées. La littérature mentionne que l'acide ascorbique, la thiamine et la riboflavine sont présents dans les proportions 2,50 1,50 et 0,28 mg/100 g, respectivement. De plus, les acides oléique et linoléique sont les principaux acides gras insaturés, tandis que les acides palmitique, stéarique et lignocérique constituent les principaux acides gras saturés [11].

1-2-Huiles essentielles :

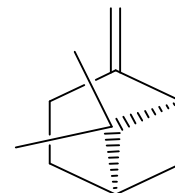
Les huiles essentielles isolées par hydrodistillation à partir des parties aériennes de *P. pinea* L. poussant en Tunisie ont été analysées par CPG et CPG/SM. Soixante-six composés ont été identifiés, représentant 98,5 % de l'huile totale. Ces dernières se sont révélées être riches en monoterpènes hydrocarbonés (73,1%). Les composés majoritaires sont [12] :



Limonène (54,1%)



α -Pinène (7,7%)



β -Pinène (3,4%)

Figure 2 : Composés majoritaires de l'huile essentielle du *P. pinea*.

2-Etude biologique :

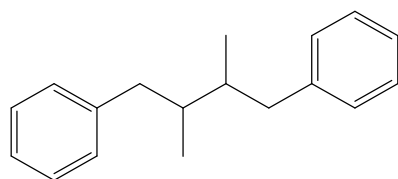
L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *P. pinea* ont montré une inhibition significative de la croissance de dix champignons pathogènes des plantes. De plus, une étude réalisée en 2012 révèle qu'elles ont des propriétés herbicides. En effet, testées sur *Sinapis arvensis* L., *Lolium rigidum* Gaud. et *Raphanus raphanistrum* L., les résultats montrent une inhibition complète de la germination des graines à des concentrations élevées. D'autre part à de faibles doses, les huiles agissent en retardant la germination et en inhibant la croissance des semis de toutes les mauvaises herbes testées [13].

B-*Pinus pinaster* :

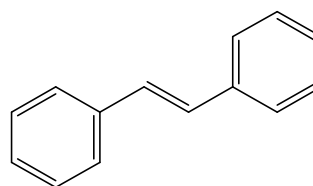
1-Etude chimique :

1-1-Flavonoïdes :

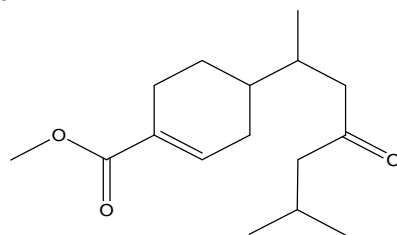
Les méthodes du CO₂ supercritique et du proche-supercritique ont été utilisées pour extraire les composés phénoliques et les composés lipophiles du bois de *P. pinaster*. Les principaux flavonoïdes isolés sont présentés ci-dessous [14] :



Lignane



Stilbène



Juvabione

Figure 3 : Les principaux flavonoïdes du *P. pinaster*.

1-2-Huiles essentielles :

L'huile essentielle du bois de *P. pinaster* a été extraite en utilisant la méthode d'hydrodistillation ainsi que deux techniques de micro-ondes assistée. Elle a été analysée, ensuite, par CPG et CPG/MS. Quarante cinq composants ont été identifiés dont les principaux sont [15] :



Figure 4 : Les composés majoritaires de l'huile essentielle du *P. pinaster*.

2-Etude biologique :

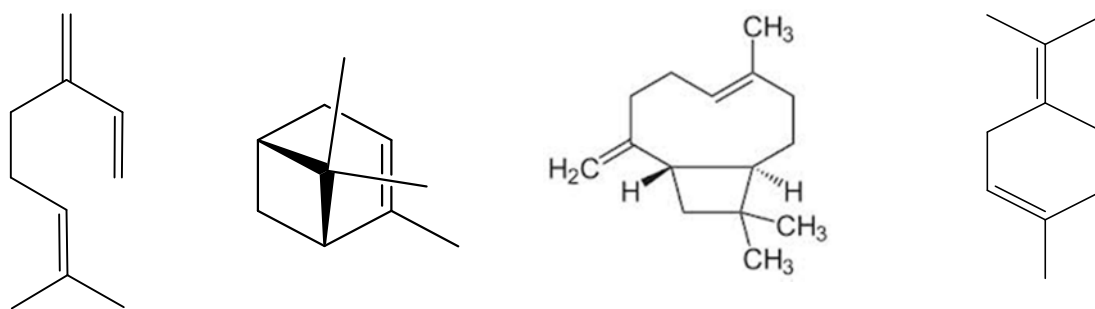
La littérature mentionne que l'huile essentielle a été évaluée pour son activité anti-oxydante par deux méthodes : piégeage des radicaux libres (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ; DPPH) et le test de réduction du fer (FRAP). L'activité anti-radicalaire la plus élevée a été obtenue pour les deux techniques à micro-ondes avec une valeur IC_{50} d'environ 15 μ g/ml. Pour le dosage de FRAP, les valeurs de 0,598 et 0,591 μ g/ml sont obtenues pour les huiles obtenues par les deux méthodes à micro-ondes et 0,307 pour la méthode d'hydrodistillation [15].

C-*Pinus halepensis* :

1-Etude chimique :

1-2-Huiles essentielles :

L'huile essentielle de la partie aérienne du *P. halepensis* obtenue par hydrodistillation a été analysée par CPG & CPG/SM. Quarante neuf composants ont été identifiés dont 26 monoterpènes, 16 sesquiterpènes, 4 diterpènes et 3 non-terpéniques. Les composants majoritaires sont [16] :



Myrcène (25,2%) α -Pinène (16,8%) β -Caryophyllène (10,9%) Terpinoplène (8,3%)

Figure 5 : Les composés majoritaires de l'huile essentielle du *P. halepensis*.

2-Etude biologique :

2-1-Activité antimicrobienne :

L'huile essentielle de *P. halepensis* provenant de l'ouest d'Algérie a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque contre 11 bactéries. Les tests ont montré que l'huile a une activité antibactérienne variable contre les souches testées. La zone maximale d'inhibition a été enregistré contre les cinq souches mentionnées ci-dessous [16] :

Tableau 3 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *P. halepensis*.

Micro-organismes	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Enterococcus faecalis</i>	9.0
<i>Lysteria monocytogenes</i>	10.0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9.5
<i>Citrobacter freundii</i>	8.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.0

2-2-Activité antifongique [17, 18] :

L'huile essentielle de *P. halepensis* extraite à partir des aiguilles montre une activité antifongique contre les champignons suivants [17] :

Tableau 4 : Activité antifongique de l'huile essentielle du *P. halepensis*.

Champignons	Diamètres d'inhibition (mm)
<i>Aspergillus flavus</i>	3
<i>Aspergillus Niger</i>	3.75
<i>Fusariumoxysporum</i>	9
<i>Rhizopusstolonifer</i>	3.5

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ching P.L., Jen P.H., Chung-S W., Chih Y.H., Chaw S.M. Comparative Chloroplast Genomics reveals the evolution of *Pinaceae* Genera and Subfamilies. *Genome Biology* **2010**, 504–517.
- [2] Farjon A., *Pinaceae* konigstein (Germany): Koeltz Scientific Book, **1990**.
- [3] Mathilde M., Larousse Agricole (le monde agricole au XXI^e siècle), **2002**, p. 480-481.
- [4] Quèzel P., Santa S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition du centre national de la recherche scientifique, Paris, **1963**, p. 616-620.
- [5] Liston A., Gernandt D.S., Vining T.F. Campbell C.S., Pinero D. Molecular phylogeny of *Pinaceae* and *Pinus*. *Acta Horticulturae* **2003**, 615:107–114.
- [6] Allen J.C., l'Œil Nature. Arbres 500 espèces, Ed. Française, **2000**. p. 72.
- [7] Mayer P. Le pin maritime, Actes Sud: Arles, France, **2007**.
- [8] Bachir K. Contribution à l'étude du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie écologie dendrométrie morphologie, **1986**, p. 6-7.
- [9] Christian D., Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique. Institut National de la recherche agronomique, **2001**, p.7-8.
- [10] Lucienne A. Les plantes médicinales d'Algérie, 2^{ème} Ed. Berti, Alger, **2010**, p. 200-201.
- [11] Cevdet N. *et al.*, Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds, *Food Chemistry*, **2004**; 86(3): 365–368.
- [12] Nizar N., Saïda T. Les protéines de réserve du pin pignon (*Pinus pinea* L.) C.R. Biologies, **2007**; 330, 402–409.
- [13] Amri I., Hamrouni L., Hanana M., Fezzani T., Jamoussi B. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil, *Journal of Pest Science* **2012**; 85: 199-207.
- [14] Enma C., Jarl H., Annika S., Beatriz Dz., Andrés M., Stefan W., Herminia D., Juan C., Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from *Pinus pinaster* wood with compressed CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids* **2013**; 81: 193-199.
- [15] Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Ansaldi M., Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy, *Flavour and Fragrance Journal* **2003**; 18: 139-134.
- [16] Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Perrucci S., Franceschi A., Macchioni G., Ceccarini L., Acaridial activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentia*, a stored food mite. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**; 50(16): 4586-8.

[17] Fekih N., Allali H., Merghache S., Chaib F., Merghache D., Dib M.A., Djabou N., Muselli A., Tabti B., Costa J. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria”, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease (APJTD)*, **2014**; 4(2): 97-103.

[18] Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A., Rebiahi S.A., Ziani-Cherif C., Bessiere J.M. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**; 5(22): 5433-5436.

CHAPITRE II: LES HUILES ESSENTIELLES

1-Introduction :

Les plantes produisent naturellement des substances actives permettant de se protéger des insectes, de maladies ou d'attaques extérieures. De celles-ci ont été tirées les huiles essentielles. De nos jours, l'utilisation des huiles essentielles est de plus en plus répandue que ce soit dans les pharmacies, ou dans divers commerces. Il existe à l'heure actuelle un intérêt croissant du public pour les produits à base de plantes et un retour aux médecines naturelles. De plus, les médias relaient ce phénomène. Les articles concernant le bien-être et la santé par les plantes et les huiles essentielles fleurissent. L'aromathérapie ou l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques est en expansion. Elle s'affirme comme une thérapeutique complémentaire dans le conseil officinal. Elle permet l'harmonisation de la santé physique et mentale [1].

2-Définition :

Une huile essentielle selon la pharmacopée est un produit de composition complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux. Selon l'AFNOR, elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation sèche. Une huile essentielle contient en moyenne soixante-quinze molécules actives [1].

Elles sont le parfum des plantes. Lorsque nous humons une rose, que nous épluchons une orange ou que nous fripons une feuille de menthe entre les doigts, c'est l'huile essentielle qui se volatilise et qui nous fait éprouver cette sensation olfactive si agréable. Elles sont à la fois des parfums et des remèdes naturels [2].

3-Composés chimiques :

Les propriétés des huiles essentielles proviennent de leur composition biochimique. Les composés qui les constituent peuvent être classés en six groupes distincts, ayant chacun des caractéristiques spécifiques [3].

➤ Les terpènes naturels :

Ce sont des hydrocarbures cycliques et volatils de formule $C_{10}H_{16}$ composés d'unités isoprènes (Figure 1). A la série isoprénique, se rattache des composés acycliques : certains contenant 5 carbones (hémiterpènes constitués d'unités isoprène), d'autres à 10 carbones (hydrocarbures, alcools et aldéhydes) qui possèdent un enchaînement se retrouvant régulièrement dans beaucoup de terpènes cycliques. Cette section réunit les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes [3].

Tous ont généralement des effets assez faibles mais leurs usages secondaires complètent l'action des autres constituants de l'huile. Ils ont surtout des propriétés bactéricides, antiseptiques, analgésiques, antivirales, expectorantes et anti-inflammatoires. Cependant, certains d'entre eux peuvent irriter la peau [3].

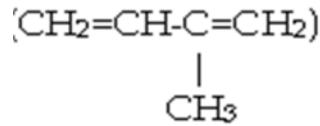


Figure 6 : Formule d'une unité isoprène.

➤ Les alcools :

Les alcools présents dans les huiles essentielles sont issus de terpènes et d'hydroxyles (ex : le menthol $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$; Figure 2). Les principaux composants résultant de ces liaisons sont les monoterpénols, les sesquiterpénols et les diterpénols. Ce sont de puissants bactéricides et antiviraux ; ils possèdent de plus la particularité de purifier le sang et ont des effets équilibrants sur le système endocrinien. D'autre part, ils n'irritent pas la peau et les huiles qui les contiennent en forte proportion sont les moins dangereuses pour les enfants et les personnes âgées. Les diterpénols ont une structure semblable à celle d'une hormone humaine [3].

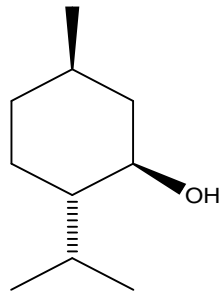


Figure 7 : Molécule de Menthol

➤ Les phénols :

Dans les essences étudiées, ces constituants ont une action plus importante que les alcools. Leur pouvoir antiseptique puissant leur a permis de servir comme désinfectant pendant la première guerre mondiale. Ils agissent également sur les systèmes nerveux et immunitaire. Cependant, un usage abusif peut irriter la peau.

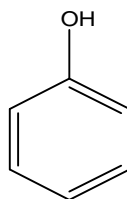


Figure 8 : Molécule de phénol

➤ Les aldéhydes :

Formés par l'oxydation des alcools, les aldéhydes dégagent en général un arôme puissant. Ils présentent aussi de nombreuses propriétés communes aux phénols et aux cétones : ils sont anti-infectieux, anti-inflammatoires, hypotenseurs, calmants et antipyrétiques. Toutefois certains de ces effets peuvent être annulés par d'autres constituants des huiles essentielles.

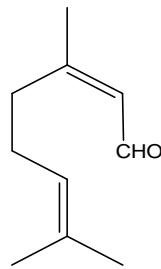


Figure 9 : Molécule de néral

➤ Les cétones :

Les quantités de cétones dans les huiles essentielles sont négligeables ; certaines d'entre elles sont des neurotoxiques. Pourtant, utilisés avec modération, ces composés ont un effet calmant et sédatif. Ils peuvent aussi faire fondre les graisses, fluidifier les sécrétions et favoriser la cicatrisation. Enfin, comme de nombreux autres composés, ils possèdent des propriétés d'analgésiques, de stimulants et d'expectorants.

➤ Les acides et les esters :

Les acides organiques et les esters jouent un rôle important dans les essences végétales. Ce sont des dérivés oxygénés des terpènes. En effet, ils ont la particularité de présenter un arôme fruité mais peuvent aussi servir d'anti-inflammatoires et de fongicides. Ils sont également efficaces contre les affections cutanées et ont un effet régulateur sur le système nerveux, calmant ou dynamisant, suivant les cas. Dans les agrumes, différents esters sont trouvés comme le citronellyl acétate, l'acétate de néryle ou encore les esters de géranyle (acétate, propionate...).

Présentes en plus ou moins grandes quantités et mélangées les unes aux autres, ces molécules vont donner aux huiles essentielles des propriétés nouvelles en plus de celles spécifiques à chaque composé pris séparément. Ainsi, le nombre de propriétés apportées par les huiles essentielles s'élève à plus d'une centaine. Cette observation va induire l'action d'une huile essentielle et donc son utilisation dans un domaine précis [3].

4-Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles :

On trouve généralement les huiles essentielles incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les huiles essentielles sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. De point d'ébullition toujours supérieur à 100°C. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques [4].

Pour les propriétés chimiques, elles sont neutres, mais acquièrent peu à peu une acidité. Elles s'oxydent à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène en même temps que leur odeur modifie, leur point d'ébullition augmente, leur solubilité diminue. Les huiles essentielles absorbent le chlore, le brome, l'iode avec dégagement de chaleur. Elles peuvent se combiner à l'eau pour former des hydrates [5].

5-Modes d'extractions des huiles essentielles :

5-1-Les méthodes conventionnelles :

❖ **Entraînement à la vapeur d'eau :**

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ».

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle [6].

❖ **Hydrodistillation simple :**

Consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité [7].

❖ **Expression à froid :** Elle est appelée aussi expression mécanique. Elle se fait par :

- ✚ **Écoulement naturel :** l'incision du tronc de certains arbres permet de recueillir un baume ou une gomme [2].

- ✚ **Ecrasement de plantes :** L'expression, aussi appelée « pression à froid » ou « grattage », est un procédé d'extraction très simple. Il est principalement utilisé pour les écorces d'agrumes (citron, pamplemousse, bergamote, orange douce et mandarine), qui renferment une quantité importante d'huile essentielle. Cette opération mécanique vise à casser les molécules qui contiennent l'essence dans les zestes des agrumes frais dans ce cas, on utilise le terme « essence » plutôt qu' « huile essentielle » [8].

❖ **Extraction par solvant :**

La technique d'extraction par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau [6].

❖ **Extraction par Soxhlet :**

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides, ou de diverses autres catégories de molécules [6].

❖ **Enfleurage :**

L'enfleurage est une ancienne méthode d'extraction manuelle des essences, complexe et très couteuse, qui n'est plus tellement pratiquée de nos jours. Elle est utilisée essentiellement pour les végétaux dont l'arôme est trop fragile pour supporter d'autres méthodes d'extractions. C'est le cas du Jasmin, du narcisse et du muguet [8].

- ✓ L'enfleurage à chaud est utilisé avec des pétales de fleurs moyennement fragiles (rose, par exemple) qui sont plongées dans un bain de graisse animale qui est chauffée à plusieurs reprises. Lorsque les fleurs ont livré toute leur essence, elles sont enlevées et remplacées par d'autres, et ce, jusqu'à l'obtention d'une graisse saturée. On obtient, ainsi, une « pommade » d'enfleurage qui pourra être utilisée comme parfum solide.
- ✓ L'enfleurage à froid est utilisé avec des pétales de fleurs fragiles. Le principe est identique, mais les pétales sont disposés sur une plaque de graisse froide.

L'inconvénient de cette technique est, d'une part, qu'elle met jusqu'à deux semaines pour prendre fin. D'autre part, elle nécessite une main d'œuvre importante. Les absolues sont donc très chères.

5-2-Les méthodes nouvelles :

❖ **Extraction par CO₂ supercritique:**

Afin que le CO₂ se trouve à l'état subcritique, la température doit être comprise entre 31 °C et 55 °C et la pression entre 0,5 et 7,4 MPa. Le CO₂ refroidi est légèrement comprimé, puis il est fortement comprimé et chauffé. Le CO₂, alors à l'état supercritique, traverse la matière première (extractor) et se charge en soluté. L'ensemble est acheminé vers un ou plusieurs séparateurs, où le CO₂ est progressivement décomprimé, perdant ainsi son pouvoir solvant. Le soluté est « libéré » et le CO₂ peut alors être recyclé [9].

❖ **Extraction assistée par micro-ondes :**

a-MAP (Microwave Assisted Process) : C'est une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes de la matière, végétale, en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble était chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement. Après, une étape de séparation par centrifugation, les échantillons étaient directement injectés sur colonne chromatographique [10].

b-Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : Basée sur un principe relativement simple, l'extraction sans solvant assistée par microondes consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, par la suite facilement séparable par simple décantation [6].

6-Utilisations des huiles essentielles [9] :

Les huiles essentielles sont principalement utilisées en raison de leurs propriétés odorantes d'une part, et de leurs propriétés médicinales.

✚ Utilisation pour leurs propriétés odorantes

Les huiles essentielles sont employées dans le secteur de la cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums ; dans les compositions parfumantes des détergents et des produits de parfumerie fonctionnelle ; mais aussi dans le domaine alimentaire.

✚ Utilisation pour leurs propriétés médicinales :

L'utilisation historique des plantes en raison de leurs propriétés thérapeutiques avec les avancées techniques et scientifiques, mené à l'isolation de principes actifs. Il faut alors distinguer phytothérapie et aromathérapie.

7-Toxicologie des huiles essentielles :

Les substances naturelles peuvent présenter des effets néfastes pour l'homme au même titre que certaines substances synthétiques. Les huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses. De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques [10].

Il a été rapporté qu'en présence de parfums, les personnes asthmatiques et développant des allergies de contact présentent des détresses respiratoires plus fréquemment que les personnes saines. Cependant, les mécanismes immunologiques n'ont pas été démontrés [11].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Florence M., Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles. *Etude de cas en maison de retraite*, **2012**, p. 7-10.
- [2] Werner M., Les Huiles Essentielles. *Réveil du corps et de l'esprit*, Ed Vioget, Collection Santé bien-être, **2002**, p.14.
- [3] Isabelle G. Les huiles essentielles, *Projet génie industries alimentaires*, lusson-gaucher, **2005**.
- [4] Rhayour K. Thèse de doctorat : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fès, Maroc, **2002**; p. 9-10, 17.
- [5] Durrafourd C., Lapraz J.C. Traité de phytothérapie clinique, 3^{ème} édition, Elsevier Masson, **2002**; p.7.
- [6] Lucchesi M.E., Thèse de Doctorat : Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des Huiles Essentielles, Université de la Réunion-France, **2006**; p.11, 16-18, 22, 23, 59.
- [7] Breneton J., Pharmacologie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} Edition, Tec & Doc, **1999**; p. 406, 410, 416-417.
- [8] Moro Buronzo A., Grand guide des Huiles Essentielles, Santé Beauté Bien être, Hachette Pratique, **2008**; p. 22, 33-38,41-43.
- [9] Besombes C. Thèse de doctorat : Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées, Université de la Rochelle, **2009**; p. 51.
- [10] J.M. Meynadier, N. Raison-Peyron. Allergie aux parfums. *Revue Française d'Allergologie*, **1997**; 3(5): 641-650.
- [11] Elberling J., Skov P.S. Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume. *Clinical and Experimental Allergy* **2007**; 37(11): 1676-80.

CHAPITRE III : EXTRACTIONS & CARACTERISATIONS DES HUILES ESSENTIELLES DES *PINUS*

I-Extraction des huiles essentielles des *Pinus*

1-Introduction :

Le terme huiles essentielles dérive de « quintaessentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation. Il signifie la fragrance et la quintessence de la plante [1]. Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras (lipides), et ne sont pas « essentiel » dans le sens qu'elles sont nécessaires à la croissance ou au métabolisme. Ce sont des composés aromatiques volatils, qui ont un aspect huileux. Elles sont obtenues à partir de plantes aromatiques par plusieurs procédés d'extraction [2]. Elles sont solubles dans les lipides et les solvants organiques et possèdent une densité inférieure à celle de l'eau [3]. Le rendement et la composition des huiles essentielles varient selon l'environnement (température, salinité, pluviosité...), la période de récolte (saison, stade de développement), l'état de plante (fraîche ou séchée) et la technique d'extraction [4]. Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents [3]. La plupart des composants des huiles essentielles sont inclus dans deux groupes: les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes, les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées [5].

2-Cueillette de la matière végétale :

Les espèces de *Pinus* étudiées (*pinia*, *pinaster* et *halepensis*) poussent à l'état spontané en Algérie. Elles ont été récoltées pendant le mois de février 2014 dans la région de Tlemcen, plus précisément à Nedroma. L'identification botanique a été réalisée par le Professeur Benabadji Nouri du Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement aux racines de ces trois espèces. Ces dernières sont séchées dans un endroit sec et aéré et à l'abri du soleil. Elles sont, ensuite, conservées pour la réalisation des extractions.

Tableau 5 : Etude bioclimatique de la station d'étude.

	Longitude	Latitude	Altitude	Climat
Nedroma	1° 73'	35° 0'	650 m	Semi-aride à hiver tempéré

3-Extraction des huiles essentielles :

Les racines des *Pinus* collectées, séchées puis conservées sont soumises au protocole d'extraction utilisant la méthode d'hydrodistillation décrite ci-dessous :

3.1-Hydrodistillation : C'est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est de la vapeur d'eau. Elle peut être utilisée pour extraire des espèces insolubles dans l'eau.

3.1.1-Principe de l'hydrodistillation : Son principe est le suivant : [6]

La substance contenant l'espèce volatile à extraire est mélangée avec de l'eau et l'ensemble est porté à ébullition.

- La phase gazeuse, contenant l'espèce volatile et la vapeur d'eau, arrive en haut de la colonne, passe dans le réfrigérant et se condense
- Le résultat de l'hydrodistillation est le distillat. Ce dernier comporte alors deux phases liquides, que nous pouvons séparer par décantation.

3.1.2-Technique : La méthode d'extraction est décrite ci-dessous :

On place la matière végétale sèche : 400 à 700 g dans 4000 ml d'eau distillée en utilisant un appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne (Council of Europe, 1996), puis on chauffe l'ensemble pendant 4 heures, après on récupère les vapeurs refroidies. Enfin, après avoir évaporé le solvant, les huiles essentielles sont conservées dans des flacons de verre scellés au réfrigérateur à 4°C.



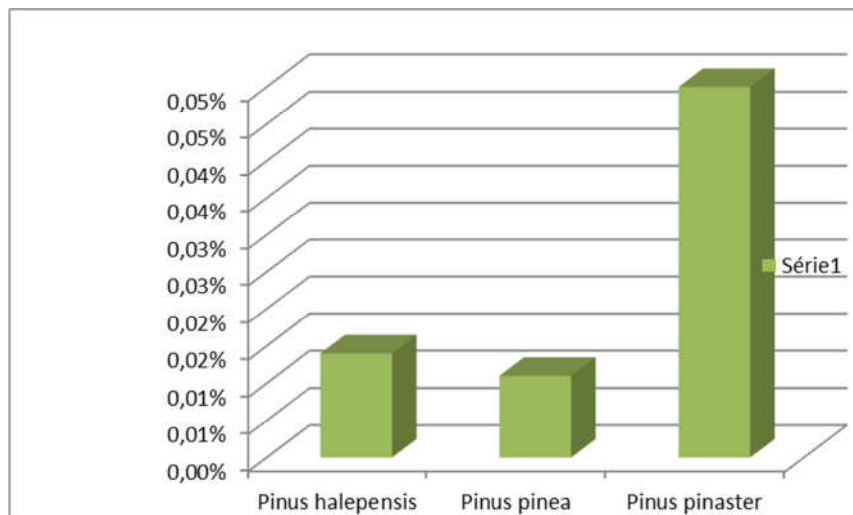
Figure 10 : Montage de l'hydrodistillation

4-Calcul du rendement :

Les rendements des extractions réalisées sont mentionnés sur le Tableau 6 :

Tableau 6 : le rendement des trois *Pinus*.

Espèces	Rendements	Couleur
<i>Pinus halepensis</i>	0,014%	Jaune pâle
<i>Pinus pinea</i>	0,011%	Jaune pâle
<i>Pinus pinaster</i>	0,05%	Jaune pâle



Histogramme 1 : Le rendement des huiles essentielles des trois *Pinus*.

Les résultats révèlent que les racines de *P. pinaster* fournissent plus d'huile que les deux autres *Pinus* étudiés, dans les mêmes conditions, à savoir période et lieu de cueillette, séchage ainsi que le mode d'extraction...

II- Caractérisation des huiles essentielles des trois *Pinus* :

Une fois les huiles essentielles extraites, nous avons procédé à leurs caractérisations par CPG et CPG/SM, méthodes de choix pour l'analyse des mélanges complexes de nature et de volatilité très variées.

1-Analyse chimique des huiles essentielles :

1-1-analyse par CPG :

La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. Comme toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire [7].

1-2-Principe :

L'échantillon est introduit, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne [8]. La séparation est basée sur la différence des interactions des composés de l'échantillon avec les deux phases : une phase mobile et une phase stationnaire [9]. En effet, les différences des pressions de vapeur des molécules de chaque composé sont à l'origine de leur partition entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les composés, qui ont traversé la colonne grâce au gaz vecteur, passent dans un détecteur les uns après les autres, après un laps de temps en rapport avec leurs propriétés physiques et chimiques [10-11]. La phase stationnaire doit être un adsorbant actif comme l'alumine, le gel de silice ou le carbone graphité (la chromatographie gaz-solide), ou un liquide fixé d'un support solide inerte tel que la brique réfractaire pilée et la terre de diatomées (la chromatographie gaz-liquide) [12].

1-3- Technique :

L'analyse quantitative a été réalisée à l'aide d'un chromatogramme en phase gazeuse de marque Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) autosystème XL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et muni de deux colonnes capillaires en silice fondue de type RTX-1 (polydiméthylsiloxane) apolaire et RTX-wax (polyéthylène glycol) polaire qui possèdent les caractéristiques suivantes (longueur : 60 m, diamètre interne : 0,22 mm, épaisseur de film : 0,25 µm. La température du four est programmé de 60 °C à 230 °C à raison d'une montée de 2 °C/min et ensuite maintenue à 230 °C pendant 35 min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 280 °C. Les échantillons ont été injectés dans le mode split (1/50), en utilisant de l'hélium comme gaz porteur (1 ml/min), le volume d'injection de l'échantillon de 0,2 µl.

2-Analyse par CPG/SM :

L'identification des composés volatils caractéristiques des plantes aromatique nécessite l'utilisation de méthodes dites couplées. Le domaine d'application des CPG/SM se confond avec celui de la CPG et tous les progrès récents de la CPG ont été transposés à la CPG/SM, notamment en termes de rapidité d'analyse. En analyse quantitative, des dosages exacts et précis sont obtenus avec une très grande dynamique de réponse, et des limites inférieures de détection parmi les plus basses de toutes les techniques d'analyse chimique, à condition de connaître et de disposer au préalable des molécules à quantifier, afin d'établir un étalonnage [13].

2-1-Principe :

L'effluent gazeux du chromatographe est dirigé, par la ligne de transfert, vers la source d'ion du spectromètre. Les analytes vaporisés sont ionisés, produisant des ions de fragmentation, qui sont, ensuite, détectés [14].

1.2.3-Technique :

Les échantillons ont été analysés avec un détecteur de masse à quadripôle de type Perkin-Elmer Turbo couplé à un chromatographe en phase gazeuse Perkin-Elmer (autosystème XL). La température de la source d'ions est fixée à 150 °C. La fragmentation est effectuée en impact électronique sous un champ de 70 eV. L'assurance-emploi spectres de masse ont été acquis sur la masse gamme 35-350 Da (temps de balayage : 1 s). La colonne utilisée est RTX-1, capillaire en silice fondue. Les autres conditions étaient les mêmes que décrites dans la CPG sauf pour le gaz vecteur l'Hélium de mode d'injection split est de rapport de fuite de 1/80.

II-Composition chimique des huiles essentielles des *Pinus* étudiés :

L'identification des composants individuels a été fondée sur la comparaison des indices de rétention IR calculé, sur les colonnes polaires et apolaires, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (König *et al.*, 2001 ; National Institute of Standards and Technology, 2005), et sur l'ordinateur correspondant à des bibliothèques commerciales (Adams, 2001 ; König *et al.*, 2001 ; National Institute of Standards and Technology, 1999) et la comparaison des spectres de masse avec ceux de notre propre bibliothèque de composés authentiques ou des données de la littérature [15-17].

Une analyse minutieuse des CPG et CPG/SM, nous a permis de dresser dans le tableau 7.

Tableau 7: Compositions chimiques des huiles essentielles des racines des *Pinus*.

N°	Compounds	IR ^a Lit	IR ^b ap	IR ^c pol	Essential Oil% ^d			Identification
					<i>P. halepensis</i>	<i>P. pinea</i>	<i>P. Pinaster</i>	
1	<i>α</i>-Pinene	931	932	1023	87,4	2,9	22	<i>RI, MS</i>
2	Camphene	943	944	1066	0,8	tr	1,1	<i>RI, MS</i>
3	<i>β</i>-Pinene	970	971	1108	1,3	0,6	27,1	<i>RI, MS</i>
4	Myrcene	970	983	1159	1	3,2	1,1	<i>RI, MS</i>
5	3-Carene	1005	1006	1147	1,5	nd	nd	<i>RI, MS</i>
6	Limonene	1020	1021	1195	0,7	66,3	1,6	<i>RI, MS</i>
7	<i>β</i> -Phelandrene	1023	1025	1208	0,1	0,2	0,3	<i>RI, MS</i>
8	Terpinolene	1078	1082	1247	0,4	nd	nd	<i>RI, MS</i>
9	<i>α</i> -Terpinolene	1161	1164	1583	0,1	nd	nd	<i>RI, MS</i>
10	Estragol	1176	1176	-	nd	0,2	nd	<i>RI, MS</i>
11	Bornyleacetate	1266	1269	1515	nd	nd	1,7	<i>RI, MS</i>
12	<i>α</i> -Longipinene	1359	1359	1475	nd	0,9	nd	<i>RI, MS</i>
13	<i>α</i> -Copaene	1379	1373	1475	0,3	nd	0,9	<i>RI, MS</i>
14	Osmorhizol	1383	1380	-	nd	3,2	nd	<i>RI, MS, Réf</i>
15	longifolène	1411	1404	1571	nd	2,7	nd	<i>RI, MS</i>
16	Trans-<i>p</i>-Caryophyllene	1424	1418	1583	3,5	9,6	21,4	<i>RI, MS</i>
17	<i>α</i> -Humulene	1456	1449	1651	0,6	1,5	3,2	<i>RI, MS</i>
18	Germacrene D	1480	1474	1692	0,3	nd	nd	<i>RI, MS</i>
19	<i>α</i> -muurolene	1496	1492	1709	0,8	nd	nd	<i>RI, MS</i>
20	NI	1373	-	-	nd	nd	3,2	
% Identification					98,8	91,3	83,6	
Monoterpènes Hydrocarbonés					93,2	73,4	52,9	
Sesquiterpènes Hydrocarbonés					5,5	14,7	25,5	
Composés non-terpéniques oxygénés					0,1	3,2	1,7	

^a: Indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire (RI_{Lit}) reportés à partir König *et al.*, 2001; ^b: Indices de rétention sur colonne apolaire (Rtx-1) ; ^c: Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-wax; ^d: % abondance normalisé sur colonne apolaire à l'exception des composés avec des RI identique (% sont donnés sur colonne polaire); tr= trace (<0.05%); MS: Spectrométrie de Masse en mode impact électronique.

Résultats & Discussion :

L'identification des constituants d'une huile essentielle est une opération délicate nécessitant l'utilisation, l'adaptation et le perfectionnement des techniques d'analyses ainsi, que la mise en œuvre d'une méthodologie d'analyse rigoureuse.

Les huiles essentielles extraites des racines de *P. pinea*, *pinaster* et *halepensis* sont analysées par CPG-Ir et CPG/SM-IE. Les analyses ont permis d'identifier pour chacune des espèces étudiées 12, 10 et 14 composés. Ces derniers représentent, respectivement, 91,3%, 80,1% et 98,8% des compositions chimiques des huiles essentielles collectives obtenues (Tableau7).

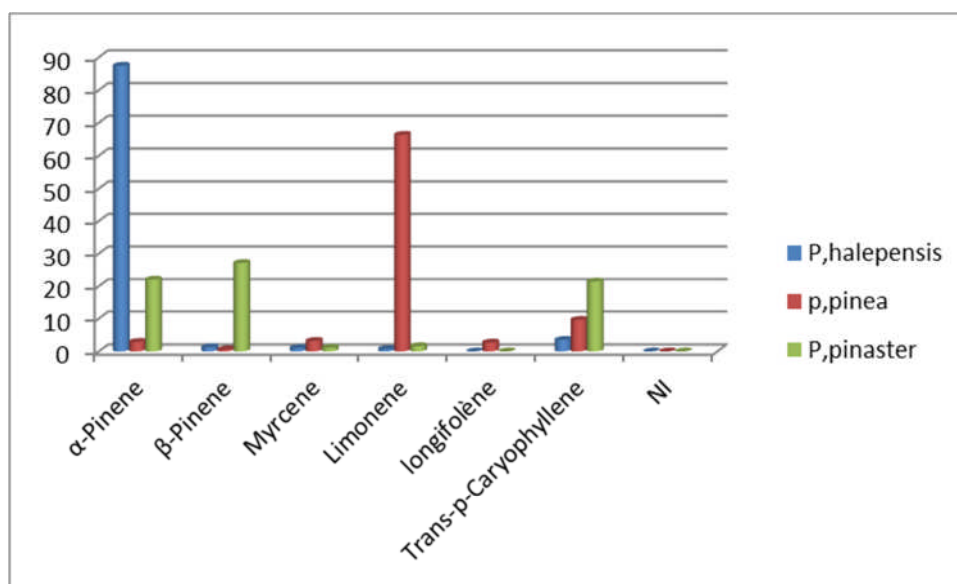
Les résultats des analyses chromatographiques (CPG-Ir & CPG/SM-IE) mentionnés sur le tableau 7 révèlent que (Voir aussi Histogramme 2) :

- Les huiles essentielles des racines des *Pinus* sont caractérisées par la prédominance des monoterpènes hydrocarbonés (*halepensis* : 93,2% ; *pinea* : 73,4% ; *pinaster* : 52,9%). Il est à noter que les constituants monoterpéniques hydrocarbonés majoritaires pour chaque espèce sont :

- *halepensis* : α -Pinène (87,4%) ;
- *pinea* : Limonène (66,3%) ;
- *pinaster* : β -pinène (27,1%).

- Les sesquiterpènes hydrocarbonés constituent la seconde classe la plus présente dans les huiles sujettes à nos investigations (*halepensis* : 5,5% ; *pinea* : 14,7% ; *pinaster* : 25,5%). Le sesquiterpène hydrocarboné le plus prédominant est le Trans-*p*-Caryophyllène (*halepensis* : 3,5% ; *pinea* : 9,6% ; *pinaster* : 21,4%).

- D'autres composés sont identifiés dans nos huiles. Il s'agit des composés non-terpéniques oxygénés (*halepensis* : 0,1% ; *pinea* : 3,2% ; *pinaster* : 1,7%).



Histogramme 2 : Les composés majoritaires des trois *Pinus*.

L'étude comparative entre les parties aériennes [17] et les racines, montre qu'il y a beaucoup de similitudes dans les compositions chimiques des huiles essentielles obtenues à partir de toutes les espèces de *Pinus* étudiées. Toutefois, nous avons noté quelques différences relatives à la nature du composé majoritaire et son abondance dans les huiles analysées. En effet, les résultats suivants sont obtenus :

- Cas du *P. halepensis*,

- Parties aériennes : α -Pinène (16,4%) ; Myrcène (25,2%) ; Trans-*p*-Caryophyllène (10,9%) ; Terpinolène (8,3%)
- Racines : α -Pinène (87,4%) ; Trans-*p*-Caryophyllène (3,5%) ; β -Pinène (1,3%) ;

- Cas du *P. pinea* :

- Parties aériennes : Limonène (56,5%) ; α -Pinène (6,5%) ; β -Phelandrène (6,2%) ; Trans-*p*-Caryophyllène (4,6%) ;
- Racines : Limonène (66,3%) ; Trans-*p*-Caryophyllène (9,6%) ; Myrcène (3,2%) ; Osmorhizol (3,2%) ; α -Pinène (2,9%)

- Cas du *P. pinaster* :

- Parties aériennes : α -Pinène (36,4%) ; β -Pinène (12,3%) ; 3-Carene (5,2%) ;
- Racines : β -Pinène (27,1%) ; α -Pinène (22%) ; Trans-*p*-Caryophyllène (21,4%) ;

De plus, la recherche bibliographique montre, que ces différences observées dans les compositions chimiques des huiles étudiées et celles des autres origines, pourrait s'expliquer par une adaptation de la plante aux facteurs abiotiques tels que, le climat, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol qui orientent la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis [19-21].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R., Newbold C.J. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* **2008**; 147: 8–35.
- [2] Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* **2004**; 94: 223–253.
- [3] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology* **2008**; 46: 446–475.
- [4] Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, **2004**; 135: 1893–1902.
- [5] Amlan K., Patra J.S. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* **2010**; 71: 1198–1222.
- [6] Bagard S., Simon N., physique-chimie, Tout-en-un, Bréal, **2008**; p. 128.
- [7] Fernandez X., Cabrol-bass D., Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. **2007**; p. 3233-5, 10.
- [8] Rouessac F., Rouessac A., Brooks S., Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. John Wiley and Sons, **2007**; p. 31.
- [9] Haven M.C., Gregory A., Schenken J.R. Laboratory Instrumentation, Ed. John Wiley and Sons, **1995**; p. 267.
- [10] Stuart B., Prichard F.E. Gas chromatography. *Royal Society of Chemistry* **2003**; p. 1.
- [11] Fox M.A., Whitesell J.K., Organic chemistry, Jones & Bartlett Publishers, **2004**; p. 163.
- [12] Organisation Mondiale de la Santé. The international pharmacopeia, *World Health Organization* **2006**; p. 1193.
- [13] Arpino P., Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. II, Techniques - Ingénieur, **2008**; p. 1491–4.
- [14] Grob R.L., Barry E.F., Modern practice of gas chromatography, Ed. Wiley-IEEE, **2004**; p. 341-343.
- [15] National Institute of Standards and Technology, NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database. Gaithersburg, MD (< <http://webbook.nist.gov/chemistry> >), **2005**.
- [16] König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils. Hamburg, Germany: Library of Mass Finder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry; **2001**. [Online] Available from: http://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library.
- [17] NIST: National Institute of Standards and Technology. PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, 1999.
- [18] Fekih N., Allali H., Merghache S., Chaib F., Merghache D., Dib M.A., Djabou N., Muselli A., Tabti B., Costa J. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller

growing in West Northern of Algeria”, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* (APJTD), **2014**; 4(2): 97-103.

[19] Baradat Ph., Marpeau A., Walter J. Terpene markers. In: Genetic Variation in European Populations of Forest Trees. G. Muller-Starck, and M. Ziehe (Eds), Sauer Lander’s Verlag, Frankfurt-am-Main, **1991**; p. 40.

[20] Ghamni M., Satrani B., Chaouch A., Aafi A., El Abid A., Ismaili M.R., Farah A. 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* **2007**; 154: 293-300.

[21] Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El Ghadraoui L., Aafi A., Farah A., Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie* **2010**; 8: 166-170.

CHAPITRE IV: ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES DES PINUS

I-Activité antimicrobienne :

1-Introduction :

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et anti-oxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques [1]

2-Définition d'un antimicrobien :

L'essor de la chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces dernières sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques [2].

3-évaluation de l'activité antimicrobienne :

Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne sont celles recommandées par l'institut des standards cliniques et laboratoires [(NCCLS, 2006) ; (CLSI, 2009)] [3].

Les tests ont été effectués sur cinq souches de bactéries de référence obtenues au niveau du (Laboratoire Antibiotiques, Antifongique: physico-chimie, la synthèse et l'activité biologique, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen) : *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiellapneumoniae* (ATCC 70063) et *Escherichia coli* (ATCC 25922) ont été choisis pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leurs pathogénicités. Les quatre souches bactériennes sont des lots de « American Type Culture Collection » : ATCC.

L'évaluation de l'activité antibactérienne est réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu solide et la technique des dilutions (sur milieu liquide et solide).

Seuls les produits qui ont donné une activité par la méthode des disques ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité par la méthode des dilutions pour une évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

3-1-Méthode de diffusion des disques sur milieu solide (NCCLS, 2006) :[3]

Pour la méthode de diffusion des disques sur milieu solide l'inoculum est ajusté au standard 0,5 McFarland (à l'aide d'un spectrophotomètre) à une absorbance de l'ordre de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm. Le 0,5 McFarland est équivalent à 10^8 UFC/ml. L'ensemencement est réalisé par inondation sur milieu Muller Hinton. Les disques, préalablement préparés et imprégnés par une dose de 10 μ l de nos huiles à tester, sont ensuite transférés dans la boîte ensemencée. Les boîtes sont enfin incubées pendant 18h à 37°C. La lecture est réalisée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. L'échelle de mesure est le suivant [4] : > 15 mm: très forte activité; <15-12 mm: de haute activité; <12-10 mm: activité moyenne; 10-7 mm: faible activité et <7 mm: aucune activité.

3-2-Méthode de dilution en milieu liquide :

A la différence de la méthode de diffusion, la méthode des dilutions sur milieu liquide permet de tester les produits directement mélangés avec milieu de culture (CLSI, 2009)[3].

Une série de concentration des produits à tester est préparée directement dans une microplaque stérile. Un volume de 20µl du produit est mis en contact avec 170µl de l'inoculum contenant 10⁶ UFC/ml (le facteur de dilution ½ est pris en considération dans le calcul des CMI). La microplaque est couverte est incubée à 37°C pendant 24h. La lecture est effectuée à l'œil nu la CMI est la plus faible concentration de la substance testée à laquelle aucun trouble visuel n'est observé.

4-Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures :

L'évaluation de l'activité des dérivés de nos extraits des levures est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide recommandée par le CLSI [3]. Les tests ont été effectués sur trois levures de référence obtenues au niveau du (Laboratoire Antibiotiques, Antifongique: physico-chimie, la synthèse et l'activité biologique, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen): *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans* (ATCC 26790) et sur *Candida albicans* (ATCC 444).

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Muller-Hinton, l'inoculum équivalent au 0,5 McFarland est préparé selon les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0,12-0,15 à une longueur d'onde de 50nm. Après ensemencement les disques immergés par les produits sont déposés après séchage de la boîte. Ces dernières sont incubées à 35°C pendant 24h. La lecture est réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

L'étude de la CMI des levures est réalisée de la même manière que celle des bactéries.

Tableau 8: Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la racine des trois *Pinus*.

Souches	Méthode de diffusion en disque DD			Méthode de Dilution		
	(mm)			CMI (mg/ml)		
	<i>P.pinea</i>	<i>P.pinaster</i>	<i>P.halepensis</i>	<i>P.pinea</i>	<i>P.pinaster</i>	<i>P.halepensis</i>
Gram-négative						
<i>Escherichia coli</i>	7		8	7	//	//
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	8		8	7	//	//
Gram-positive						
<i>Staphylococcus aureus</i>	17		19	20	5	3,25
<i>Bacillus cereus</i>	7		12	10	//	1,63
<i>Listeria monocytogenes</i>	12		7	15	25	//

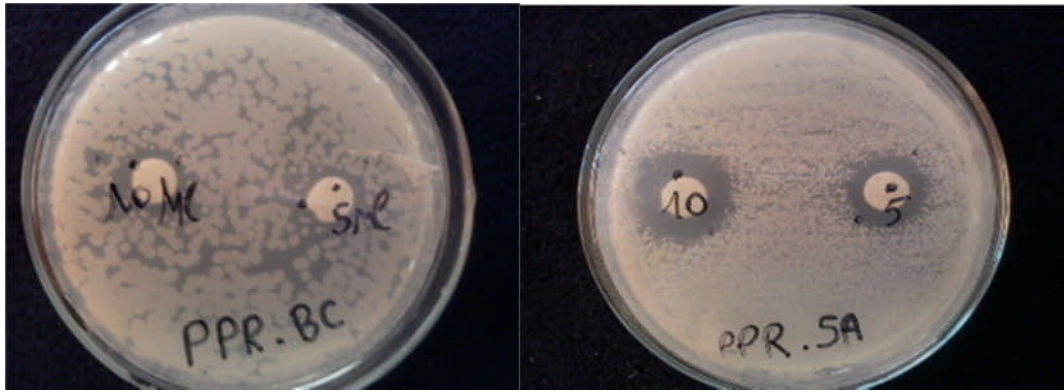


Fig.11 :Le diamètre d'inhibition de H.E de *Pinus pinaster*

Fig.12 :Le diamètre d'inhibition de H.E de *Pinus pinaster* contre *staphylococcus aureus*

Tableau 9: Activité antifongique de l'huile essentielle de la racine des trois *Pinus*.

levures	Méthode de diffusion en disque DD (mm)		
	<i>P.pinea</i>	<i>P.pinaster</i>	<i>P.halepensis</i>
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	7	11	10
<i>Candida albicans</i> (ATCC 26790)	14	25	8
<i>Candida albicans</i> (ATCC 444)	20	8	7



Fig.13 : Le diamètre d'inhibition de H.E de *Pinus pinaster* contre *Candida albicans* ATCC 26790.

Fig.14 : Le diamètre d'inhibition de H.E de *Pinus pinaster* contre *Candida albicans* ATCC 10231.

DD= Diamètre de la diffusion du disque (mm).

CMI = Concentration minimale inhibitrice ($\mu\text{g/ml}$).

//=pas d'activité.

4-1-Discussion des résultats :

Le Tableau 8 résume l'évaluation de la sensibilité des bactéries choisies vis-à-vis des huiles essentielles de *P.pinea*, *P.pinaster* et *P.halepensis* provenant des stations de Nadroma.

Les résultats montrent que les souches bactériennes à Gram (+) testées sont très sensibles aux huiles essentielles de trois *Pinus*, notamment contre *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

En revanche, les trois *Pinus* n'ont pas révélé le même pouvoir antibactérien contre l'ensemble des souches à Gram (-) testées qui sont *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063) et *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Ces résultats ont été confirmés par la méthode de dilution CMI, la souche *Bacillus cereus* (ATCC 11778) donne la meilleure activité antimicrobienne puisqu'elle représente la plus petite concentration inhibitrice pour *P. pinaster*. Ainsi que les souches *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) donnent une bonne activité pour *P.halepensis* et *P.pinea*. D'autre part, les bactéries *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063) et *Escherichia coli* (ATCC 25922) possèdent une faible sensibilité vis-à-vis des trois *Pinus*.

-D'autre part, les huiles essentielles des racines des *Pinus* étudiés, ont été testé contre trois levures, d'où *P.pinea* et *P. pinaster* se sont révélé efficace contre *Candida albicans* (ATCC 26790) et *Candida albicans* (ATCC 444) pour un diamètre d'inhibition valant de 14 à 25 mm. Mis à part l'huile du *P.halepensis* qui s'est montré inefficace. *Candida albicans* (ATCC 10231) s'est dévoilé être résistance pour les trois HEs.

Il est à noter que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est due, principalement, à sa composition chimique, et en particulier, à la nature de ses composés majoritaires [6-7]. Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans les huiles essentielles [8-9].

II- ACTIVITE ANTIOXYDANTE :

1-Introduction :

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires [10-12].

2-définition :

L'activité anti-oxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation, ainsi que la capacité anti-oxydante de l'huile volatile est étroitement liée à tout le contenu phénol [13]. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés anti-oxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) [14-17].

3-méthodes d'évaluation des propriétés anti-oxydantes in vitro:

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro et in vivo, l'activité anti-oxydante par piégeage de radicaux différents, comme :

3-1-Test de β -carotène :

Le β -carotène est un indicateur d'oxydation. C'est un antioxydant lipophile qui protège les acides gras de l'oxydation. L'absorbance du β -carotène est mesurée à 470 nm [18]

3-2-Test Rancimat:

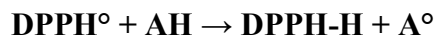
Ce test consiste à mesurer la dégradation d'un corps gras face à une auto-oxydation accélérée, dans un appareil automatisé qui chauffe les solutions à 100 °C environ avec un apport d'air constant. Cet appareil détecte les composés volatils libérés qui indiquent indirectement le degré d'oxydation des huiles [19].

3-3-Test FRAP(*Ferricreducingability power*):

C'est une réaction chimique de réduction du fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe (II). L'absorbance est déterminée à 700nm [20].

3-4-Test de réduction du radical stable, le DPPH° :

Le corps à doser est ajouté à une solution de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) qui est un radical stable et coloré. Le maximum de son absorption dans le visible se situe vers 517 nm dans le méthanol ou l'éthanol. La réduction du radical par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) et au radical (A°) [21-22].



4-Evaluation de l'activité anti-oxydante :

4-1 -Test de réduction du radical stable, le DPPH° Utilisé en tant que réactif, DPPH (2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl hydrate) offre évidemment une méthode pratique et précise pour titrer les groupes oxydables d'origine naturelle ou synthétique antioxydants. Le protocole est comme suit : 100ml d'éthanol est ajouté à 0,0027g de DPPH et mélangé avec un volume égal d'extraits d'essai à différentes concentrations (2,16 à 10 mg/ml) et maintenus dans l'obscurité pendant 30 min. Absorbance a été lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Appareil U.V. : Apotizen. POP UV-Visible Spectrophotomètre, N°série : 5u3100-105013-00). Pour chaque dilution on prépare un blanc constitué de 1ml de la solution à tester et 1ml d'éthanol.

Le contrôle négatif est composé de 1ml de la solution éthanolique au DPPH et de 1ml d'éthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

4-1-1-Expression des résultats :

❖ Calcul des pourcentages d'inhibition :

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante:

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100 \quad [23]$$

A_C : Absorbance du contrôle ;

A_T : Absorbance du test effectué.

❖ Calcul des IC₅₀ : [24]

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour *Efficient concentration*50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH'. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

Concentration1 :10mg/ml

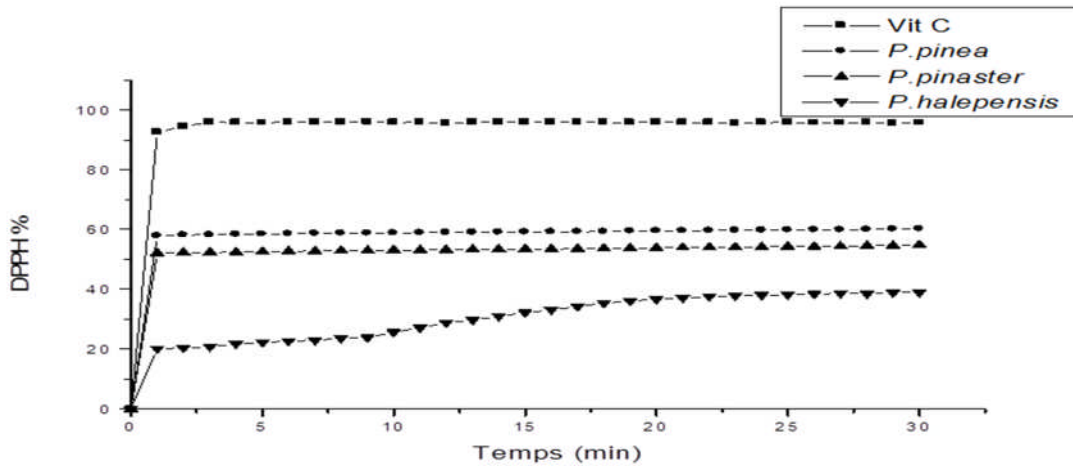


Fig.15 : Pourcentage de réduction de DPPH en fonction du temps des trois *Pinus* et de l'acide ascorbique pour concentration1.

Concentration2 : 6mg/ml

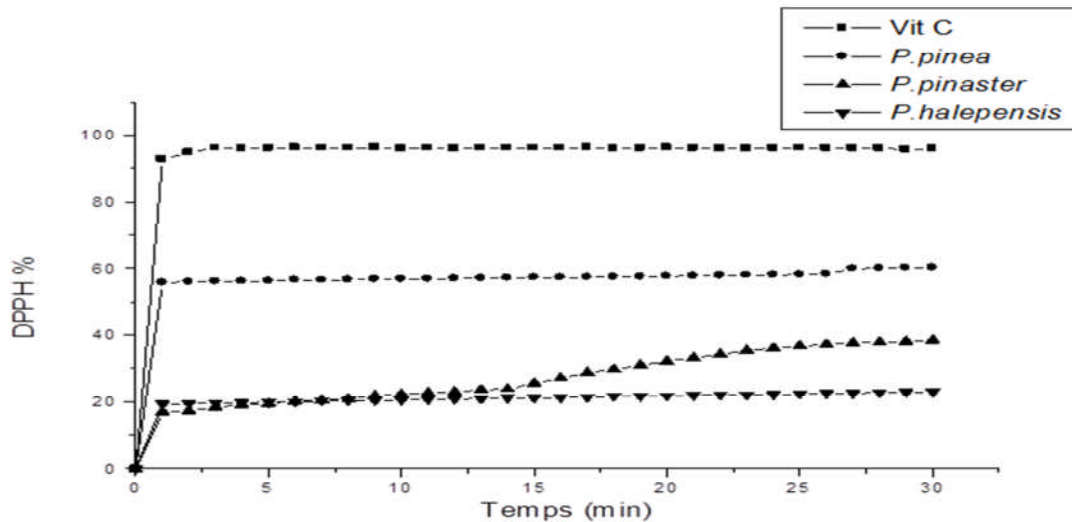


Fig.16 : Pourcentage de réduction de DPPH en fonction du temps des trois *Pinus* et de l'acide ascorbique pour concentration2.

Concentration3 : 3,6mg/ml

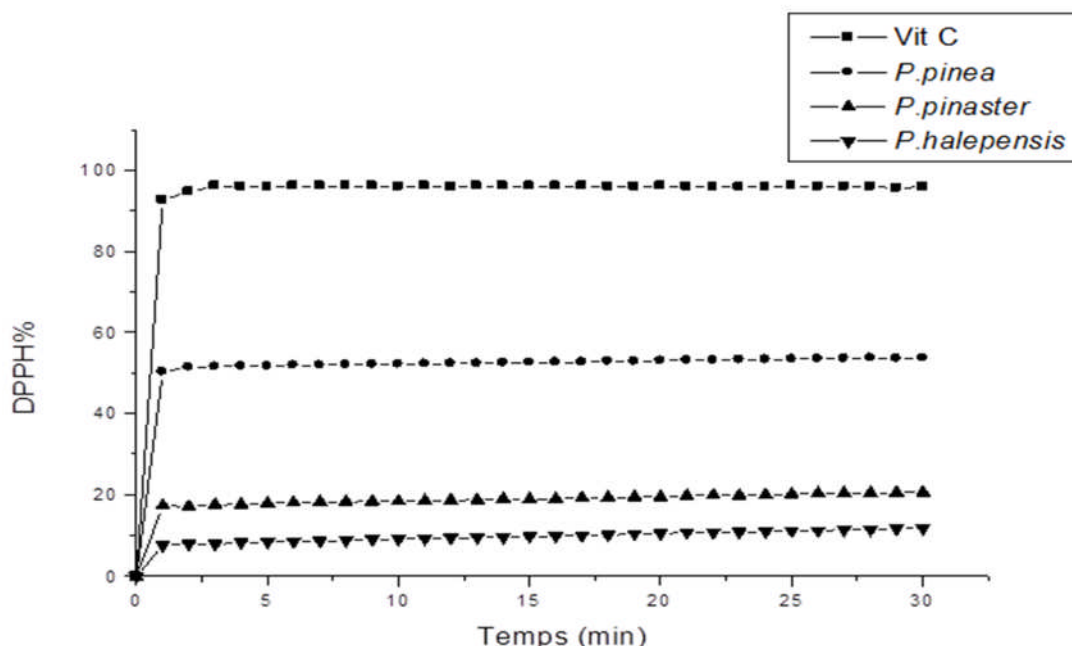


Fig.17 : Pourcentage de réduction de DPPH en fonction du temps des trois *Pinus* et de l'acide ascorbique pour concentration3.

4-1-2-Résultat et discussion :

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles de *P.pinea*, *P.pinaster* et *P.halepensis*, provenant des stations de Nedroma sont évaluées par la mesure des absorbances à différentes concentrations. La comparaison et la validation des résultats sont effectués avec un contrôle positif utilisant l'acide ascorbique.

Après avoir réalisé la cinétique de nos trois *Pinus* qui a pour but de faire un suivi de la réaction de réduction à un temps donné et aussi trouvé le IC_{50} expérimentalement, on a remarqué pour la première concentration que le pourcentage de réduction pour l'acide ascorbique il est de 97%. A cette même concentration nous avons constaté que le pourcentage de réduction du *P.pinea* est de 57,84%, or pour le *P.pinaster* le pourcentage est de 52%, alors que pour le *P.halepensis* on voit une augmentation de 20 à 30% pour un temps de 30 minutes.

A la lumière de la lecture de nos trois courbes, on en déduit que l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle de *P.pinea* est la plus intéressante. L'ordre de la tendance des huiles essentielles de réduire les radicaux libres du DPPH est le suivant : *P.pinea* ($IC_{50}= 10$ mg/ml) > *P.pinaster* ($IC_{50}= 3,6$ mg/ml) > Acide ascorbique ($IC_{50}=0,047$ mg/ml), or pour le *P.halepensis* aucune activité anti-oxydante n'a été remarqué pour les trois concentrations.

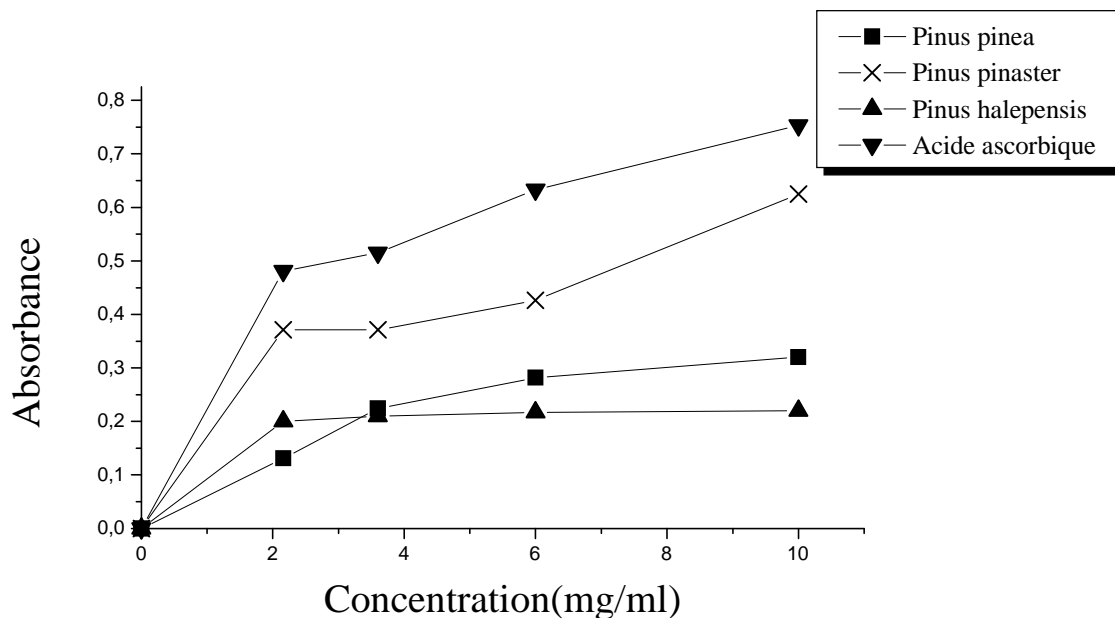
Cependant, on a prouvé que l'activité anti-oxydante des composés majoritaires testés séparément donne souvent des résultats inférieurs comparés à l'activité de la totalité de l'HE [25]. En général, les interactions synergiques entre les différents constituants d'une HE sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important [26].

4-2- Réduction du Fer : FRAP (*Ferricreducingantioxidant power*) :

Le protocole expérimental suivi est celui de Karagözler *et al*, 2008. 1 ml de l'échantillon à différentes concentrations (concentrations initiales : 0.216mg/ml, 0.36mg/ml, 0,6mg/ml et 1mg/ml), est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés pendant 10 min. 2.5 ml du surnageant sont ajoutés à 2.5 ml d'eau distillée et 500 μ l d'une solution de chlorure du fer ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0.1% sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Appareil U.V.Apotizen.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

4-2-1-Interprétation des résultats :



Les résultats obtenus par la méthode de FRAP confirment le potentiel antioxydant modéré des huiles essentielles des racines de *P.pinea*, *P.pinaster* et *P.halepensis*. En effet, les tests montrent que les huiles de *P.pinea* et de *P. pinaster* possèdent une bonne affinité avec les ions Fe^{3+} . Cette capacité de réduction des radicaux libres par les huiles essentielles de ces huiles est due, principalement, à leur profil chimique riche en composés phénoliques tels que le l'estragol. Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulier [27-29].

5-conclusion :

Les activités antimicrobienne et anti-oxydante observées sont dues, principalement, à la composition chimique de ces huiles. L'ensemble de ses résultats laisse entrevoir des perspectives de la recherche de formulation à base des huiles essentielles étudiées à la place de certains conservateurs ou antioxydants de synthèse dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]Bouguerra A. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire, **2011**, p. 10.
- [2]Commission Européenne : proposition de la commission en matière de lutte contre la résistance microbienne. Bruxelles. In Kechkar M. Extraction de Silymarine et étude de son activité antimicrobienne. *Mémoire de magister*. Université Mentouri Constantine. Algérie, **2008**, p.99.
- [3] CLSI., Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically Approved standard M7-A7.Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, **2006**; 26(2).
- [4]Barros L., Ferreira M.J., Queiros B., Ferreira, I.C.F.R., and P.Baptista, Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities, *Food Chem.* **2007** ; 103 : 413-419.
- [5]Espinel-Ingroff A. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin. *J. Clin. Microbiol.*; **2007**, 45:1811–1820.
- [6]Lawrence B.M., A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries, Ed. New crops, Wiley, New York, **1993**, p. 620-627.
- [7]Dorman H.J, Deans S.G., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **2000**; 88(2) :308-316.
- [8]Belaiche T., Tantaoui-Elaraki A., Ibrahimy A., Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes, *Sciences Des Aliments*, **1995** ; 15(6) : 571-578.
- [9]Tzakou O, Bazos L., Yannitsaros A., Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, **2007**; 22(5) :358–362.
- [10]Sanchez-Moreno C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, **2002** ; 8 (3) :121-137.
- [11]Marc Fr., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C. et all. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, **2004** ; 20(4) : 458-463.
- [12]Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005** ; 53 :p. 1841-1856.
- [13]Stefanovits B, Effect of bioactive compounds of table beet cultivars on alimentary induced fatty livers of rats, *Acta alimentaria*, **2009** ; 38(3) :267-280.
- [14]Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, **1995** ; 22 :375-383.

- [15]Burda S., Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49 :2774-2779.
- [16]Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **2002** ; 127 :83-198.
- [17]Bartosz G. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, **2003** ;9 :5-21.
- [18]Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2003**; 51: 615- 622.
- [19]Mendez E., Sanhueza J., Speisky H., Valenwuela A., Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oil. *Journal of American Oil Chemical Society*, **1996**; 73: 1033- 1037.
- [20]Benwie F.F., Strain J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **1996**; 239:70- 76.
- [21]Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and technology*, **1995**; 28:25- 30.
- [22]Sanchez-Moreno C., Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, **2002**; 8(3):p.121-137.
- [23]Wang J. et Mazza G., Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds On the Production of Tumor Necrosis Factor, *Journal Agric Food Chemistry*, 50 :4183-4189.
- [24]Mensor L. et al, Screening of Brazilian plant extract for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.* 15: 127-130.
- [25]Safaei-Ghomi J., GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, 115 :1524.
- [26]Vardar-Ünlü G., Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch, *Food Chemistry*, **2003**, 51 :.63.
- [27]Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *roslans*, *Journal of Food Engineering*, **2005** ;66(4) :447-454.
- [28] Tepe B., Sihoglu-Tepe A., Daferera D., Polissioub M., Sokmenc A., Chemical composition and activity of the essential oil *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry*, **2007** ;103(3) :766-770.
- [29]Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B., The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavoids, *Free Radical Research*, **1995** ;22(4) :375-383.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux présentés dans ce mémoire contribuent à la valorisation de trois plantes médicinales de l'ouest d'Algérie. Après avoir caractérisé les huiles essentielles, on s'est consacré par la suite à leur valorisation par le biais de la réalisation des tests biologiques.

La composition chimique des huiles essentielles extraites des parties aériennes de *P. pinea*, *P. pinaster* et *P. halepensis* provenant de l'ouest d'Algérie et plus précisément de Nedroma, a déjà fait l'objet d'une étude détaillée par une analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG, Ir et CPG/SM-IE).

L'analyse de nos trois racines nous a montré que l'huile de *P. pinea* s'est avérée riche en monoterpènes hydrocarbonés (73,4%) de constituant majoritaire Limonène (66,3%), et en sesquiterpènes hydrocarbonés (14,7 %). L'huile essentielle de *P. pinaster* a fait aussi l'objet de notre étude, elle renferme majoritairement les monoterpènes hydrocarbonés (52,9%) les monoterpènes oxygénés (1,7%) et les sesquiterpènes hydrocarbonés (25,5%). Par ailleurs, l'huile essentielle de *P. halepensis* est riche en monoterpènes hydrocarbonés (93,2%) et de sesquiterpènes hydrocarbonés (5,5%).

Cependant les composés oxygénés non-terpéniques se trouvent dans *P. pinea* et *P. pinaster* avec des pourcentages faibles 3,4% et 1,7% respectivement.

Les tests antimicrobiens des HEs effectués, par deux méthodes différentes : la méthode de diffusion en disque et la dilution, sur les souches bactériennes suivantes : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) et de *Bacillus cereus* (ATCC 11778) ont donné une bonne activité antimicrobienne. Par contre, les souches *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063) et *Escherichia coli* (ATCC 25922) se sont révélées résistantes.

D'autre part, l'activité antioxydante des huiles est, également, testée avec deux méthodes, à savoir la réduction relative du radical (DPPH) et le test de réduction de fer (FRAP). Les tests montrent un pouvoir antioxydant modéré des huiles essentielles de *P. pinea* et *P. pinaster*.

Résumé

Les compositions chimiques des huiles essentielles isolées à partir des racines de *Pinus halepensis*, *P. pinaster* et *P. pinea* poussant en Algérie, ont été étudiées par CPG et CPG/SM. L'huile de *P. halepensis* s'est révélée être riches en monoterpènes hydrocarbonés (93,2%), avec α -pinène (87,4%) comme constituant majoritaire. Les composés les plus abondants dans l'huile *P. pinaster* sont α -pinène (22,0%), β -pinène (27,1%) et trans-*p*-caryophyllène (21,4%), tandis que l'huile de *P. pinea* contient limonène (66,3%), constituant majoritaire. Les huiles ont été testées pour leur effet inhibiteur sur les bactéries et les champignons. L'examen de l'activité antimicrobienne a révélé que les huiles de *P. pinaster* présentaient une activité définie contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. De plus, les activités antioxydantes, déterminées par deux méthodes: DPPH & FRAP, ont montré que les huiles essentielles ont des potentiels antioxydants modérés, comparés à d'autres espèces de *Pinus* cités dans la littérature.

Mots clés: *Pinaceae*; *Pinus halepensis*; *Pinus pinea*; *Pinus pinaster*; Huiles Essentielles; Activité Antibactérienne; Activité Antioxydante

Abstract

The composition of the essential oils isolated from the roots of *Pinus halepensis*, *P. pinaster*, and *P. pinea* grown in Algeria were investigated by GC and GC/MS. The oil of *P. halepensis* was found to be rich in monoterpene hydrocarbons (93.2 %), with α -pinene (87.4 %) being the major component. The most abundant compounds in *P. pinaster* oil were α -pinene (22.0 %), β -pinene (27.1 %) and trans-*p*-caryophyllene (21.4 %), while the oil of *P. pinea* contained limonene (66.3%) as a major component. The oils were tested for their inhibitory effect against bacteria and fungi. Examination of the antimicrobial activity revealed that *P. pinaster* oils exhibited a definite activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The antioxidant activity determined by two methods: DPPH radical scavenging test and ferric reducing-antioxidant power (FRAP) assay showed that the essential oils have a moderate antioxidant potential, compared to others species of *Pinus* in the literature.

Keywords: *Pinaceae*; *Pinus halepensis*; *Pinus pinea*; *Pinus pinaster*; Essential oils; Antibacterial activity; Antioxidant activity

ملخص

قد تم التحقيق في التركيب الكيميائي للزيوت العطرية المعزولة من جذور *P. pinaster*، *P. halepensis* و *P. pinea* في الجزائر عن طريق GC و GC/MS. تم العثور على زيت من *P. halepensis* غنية من أحادي تربين الهيدروكربونات (93.2 %)، مع α -بينين (87.4 %) كونها عنصرا رئيسيا. كانت المركبات الأكثر وفرة في زيت *P. pinaster* α -بينين (22.0 %)، β -بينين (27.1 %) و كريفلان (21.4 %)، في حين أن الزيت الواردة من *P. pinea* غنية من الليمونين (66.3 %). تم اختبار الزيوت لتأثير كبح ضد البكتيريا والفطريات. كشفت دراسة النشاط البكتيري أن زيوت *P. pinaster* أظهرت نشاط واضح ضد المكورات العنقودية الذهبية و العسوية الشمعية. النشاط المضاد للأوكسدة التي تحدها طريقتين : DPPH و FRAP الفحص أظهر أن الزيوت الأساسية لديها إمكانات المضادة للأوكسدة معتدلة، مقارنة مع الأنواع الأخرى من الصنوبر.

الكلمات الرئيسية: *Pinaceae*; *P. halepensis*; *P. pinea*; *P. pinaster*; الزيوت الأساسية؛ النشاط المضاد للبكتيريا؛ النشاط المضادة للأوكسدة