

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCCEN



Faculté des Sciences - Département de Chimie
Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives
(LASNABIO)



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences en Chimie
Option : Chimie Organique Appliquée

Thème

PROPRIETES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES DE TROIS ESPECES DU GENRE *PINUS* POUSSANT EN ALGERIE

Présentée par : **Nadia FEKIH**

Soutenue le 30/12/2014 devant le jury composé de :

TABTI Boufeldja	Professeur, Université de Tlemcen, Algérie	Président
BELOUATEK Aïssa	Professeur, Université de Mostaganem, Algérie	Examineur
BOUSALEM Smain	Professeur, Centre Universitaire d'Aïn Témouchent, Algérie	Examineur
BEGHALIA Mohamed	MC (A), Centre Universitaire de Tissemsilt, Algérie	Examineur
MERGHACHE Salima	Professeur, Université de Tlemcen, Algérie	Co-Encadreur
ALLALI Hocine	Professeur, Université de Tlemcen, Algérie	Encadreur

Année Universitaire 2014/2015

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives (**LASNABIO**) Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur **ALLALI Hocine**, Professeur à l'université de Tlemcen. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche. Je le remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir été présent aussi souvent que possible malgré ses tâches administratives.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à Madame **MERGHACHE Salima** Professeur à l'université de Tlemcen. Je la remercie pour sa pleine disponibilité, son aide permanente, ses précieux conseils et ses connaissances scientifiques, qui m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches. Je la remercie, également, pour ses grandes qualités humaines et son soutien moral, tout au long de ces années.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur **TABTI Boufeldja**, Professeur à l'université de Tlemcen, pour avoir accepté de présider ce jury.

Ma gratitude va également à Monsieur **BELOUATEK Aïssa**, Professeur à l'université de Mostaganem, pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury.

Ma gratitude va également à Monsieur **BOUSALEM Smain**, Professeur au Centre Universitaire d'Aïn Témouchent, pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury.

Mes chaleureux remerciements vont également à Monsieur **BEGHALIA Mohamed** Maître de Conférences au Centre Universitaire de Tissemsilt, pour son aimable participation au jury.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **GHALEM Saïd**, directeur du laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives (**LASNABIO**).

Je tiens à remercier le professeur **BENABADJI Noury** (Laboratoire de Botanique, Département de Biologie, Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen) pour l'identification de la matière végétale.

Je remercie Monsieur **DIB M.A** pour son aide précieuse, les conseils fructueux et les encouragements tout au long de mon travail.

Ma profonde reconnaissance va également à monsieur le Professeur **Jean COSTA**, Directeur du laboratoire de chimie des produits naturels (**CPN**), Université de Corse, France, pour les analyses CPG et CPG/SM.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **SELLES Chaouki**, pour ses précieux conseils et l'enrichissement scientifique dont j'ai bénéficié dans la partie pratique de ce mémoire.

Je tiens à remercier Monsieur **MUSELLI Alain** et Monsieur **DJABOU Nassim**, pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la réalisation des analyses des huiles essentielles par CPG et CPG/SM.

Je remercie mes collègues et amies pour leur soutien et plus précisément **BENYELLES Batoul**.

Je n'oublie pas nos techniciennes Khéra et Imane pour leur aide matérielle.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A Mes parents pour leur soutien, leur amour et leur sagesse qui m'ont permis d'aboutir au grade de Docteur en Chimie et de devenir la personne que je suis.

A Mes beaux-parents pour leur présence de tous les instants, leur sympathie et leurs encouragements qu'ils m'ont apportée.

A Mon mari Omar pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles.

A Mon fils Fayçal pour la joie qu'il nous procure.

A Ma grande mère.

A Mes frères, et mes beaux-frères.

A Ma sœur et ma belle-sœur.

A ma cousine Hanane pour son aide.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : Chimie des huiles essentielles	
I.1.Introduction.....	5
I.2. Bref historique.....	5
I.3. Qu'est-ce qu'une huile essentielle ?.....	6
I.4. Localisation des huiles essentielles.....	6
1.5 Rôle des H.E pour le règne végétal.....	7
I.6 Facteurs de variabilité des H.E.....	8
I.6.1 Origine botanique.....	8
I.6.2 L'organe producteur.....	8
I.6.3 Origine géographique.....	8
I.6.4 Conservation des plantes.....	8
I.6.5 Le mode d'extraction.....	9
I.7 De la plante à l'huile essentielle.....	9
I.7.1 Par distillation.....	9
I.7.2 Par enfleurage.....	10
I.7.3 Extraction au CO ₂ supercritique.....	10
I.7.4 Extraction sans solvant.....	10
1.8 Composition des huiles essentielles.....	11
I.8.1 Origine biogénique des huiles essentielles.....	11
I.8.2 Les phénylpropanes (composés aromatiques).....	13
I.9 Méthodes d'analyses des huiles essentielles.....	13
I.9.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	13
1.9.2 Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM).....	14
I.10 Action biologique, effets thérapeutiques.....	16
I.11 Utilisation des H.E.....	18
I.12 Toxicité des huiles essentielles.....	18
Références bibliographiques.....	19

CHAPITRE II : Pouvoir antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles

II.1 Introduction.....	24
II.2 Activité antioxydante	24
II.2.1 Radicaux libres et stress oxydatif.....	24
II.2.2 Activité antioxydante et les antioxydants.....	25
II.2.3 Les sources des antioxydants.....	26
II.2.4 Méthodes d'évaluation des propriétés anti-oxydantes <i>in vitro</i>	28
II.2.4.1 Test de réduction du radical stable, le DPPH°.....	28
II.2.4.2 Test FRAP (Ferric reducing ability power).....	30
II.3 Activité antimicrobienne.....	31
II.3.1 Introduction.....	31
II.3.2 La diversité du monde microbien.....	31
II.3.2.1 Les bactéries.....	31
II.3.2.2 Les champignons.....	31
II.4 Des propriétés antimicrobiennes importantes des huiles essentielles.....	36
II.5 Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	37
II.5.1 Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque).....	37
II.5.2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution).....	38
II.5.2.1 La dilution en bouillon.....	38
II.5.2.2 La dilution en gélose.....	38
II.5.2.3 Méthode bio autographique.....	38
Références bibliographiques.....	39

CHAPITRE III: Synthèse bibliographique sur les espèces retenues

III.1Présentation de la famille des pinacées.....	44
III.2 Répartition géographique	45
III.3 Description botanique des plantes étudiées	45
III.3.1 <i>Pinus halepensis</i>	45
III.3.2 <i>Pinus pinaster</i>	46
III.3.3 <i>Pinus pinea</i> (pin parasol).....	47
III.4 Taxonomie.....	47
III.5 Utilisations traditionnelles.....	48
III.6 Travaux antérieurs.....	48

III. 6. 1 Flavonoïdes.....	48
III.6. 2 Composés phénoliques - Acides gras –Terpénoïdes.....	49
III.6. 3 Lipides.....	50
III.6. 4 Huiles essentielles.....	50
Références bibliographiques.....	51

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

IV.1 Introduction.....	56
IV.2 Echantillonnage et période de récolte.....	56
IV.3 Identification botanique.....	57
IV.4 Le stockage des plantes.....	57
IV.5 Extraction des huiles essentielles.....	57
IV.6 Principe de l'hydrodistillation.....	58
IV.7 Description de la méthode d'hydrodistillation.....	58
IV.8 Détermination des rendements des huiles essentielles.....	59
IV.9 Analyse des huiles essentielles des <i>Pinus</i> par CPG et CPG/SM.....	60
IV.10 Etudes statistiques.....	61
IV.11 Activités biologiques.....	62
IV.11.1 Activité antioxydante.....	62
IV.11.2 Activité antimicrobienne.....	64
Références bibliographiques.....	67

CHAPITRE V: Analyse chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*

V.1 Introduction.....	69
V.2 Huiles essentielles de <i>P. halepensis</i>	69
V.2.1 Huiles essentielles de différentes parties de <i>P. halepensis</i>	69
V.2.2 Effet du cycle végétatif sur le rendement et la composition de l'huile essentielle	74
V.2.2.1 Caractéristiques chimiques.....	74
V.2.2.2 Composition chimique.....	74
V.2.3 Variabilité chimique inter – stations des huiles essentielles de <i>P. halepensis</i>	78
V.2. 4 Durée de conservation de la matière végétale.....	84
V.2.5 Etude comparative.....	88
V.3 Huiles essentielles de <i>P.pinea</i>	88

V.3.1 Huiles essentielles des parties de <i>P. pinea</i>	88
V.3.2 Variabilité chimique inter stations des huiles essentielles de <i>P. pinea</i>	92
V.4 Huile essentielle de <i>P. pinaster</i>	99
V. 4 .1 Huiles essentielles de différentes parties de <i>P. pinaster</i>	99
V.4. 2 Etude de la variabilité chimique.....	104
V.5 Etude comparative de la composition chimique des huiles essentielles des trois espèces.....	111
Références bibliographiques	114
CHAPITRE VI : Investigation biologique des huiles essentielles de trois <i>Pinus</i>	
VI.1 Introduction.....	116
VI.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	116
VI.3 Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	123
Références bibliographiques	128
CONCLUSION GENERALE.....	129
Travaux de recherche.....	131

LISTE DES ABREVIATIONS

ABS : Absorbance

ACP : Analyse en Composante Principale

ATCC : American type culture collection

CC : Chromatographie liquide sur colonne ouverte

CCM : Chromatographie sur couche mince

CHA : Classification Hiérarchique Ascendante

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG /SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DMAPP : Diméthylallylpyrophosphate

DMSO : Diméthyl sulfoxide

DO : Densité Optique (absorbance)

DPPH: 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

FID: Flame Ionisation Detector

FPP : Farnésylpyrophosphate

FRAP: Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (*Ferric reducing/antioxidant power*)

g : Gramme

GGPP : Géranylgeranylpyrophosphate

GPP : Géranylpyrophosphate

H : Heure

HD : Hydrodistillation

H.E : Huile essentielle

IC50 : Concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres

IPP : Isoprénopyrophosphate

IR : Indice de rétention

ml : Millilitre

mm : Millimètre

mn : Minute

N : Nord (Latitudes)

O : Ouest (Longitudes)

OMS : organisation mondiale de la santé

P.A.M : Plantes aromatiques et médicinales

P.H.A : Parties aériennes de *Pinus halepensis*

P.H.R : Racines de *Pinus halepensis*

P.M.A : Parties aériennes de *Pinus pinaster*

P.M.R : Racines de *Pinus pinaster*

P.P.A : Parties aériennes de *Pinus pinea*

P.P.R : Racines de *Pinus pinea*

Rdt : Rendement

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SM : Spectrométrie de masse

TEC₅₀ : temps nécessaire pour aboutir la concentration EC50

tr : Trace

% : Pourcentage

µl: Microlitre

Liste des figures

- Fig. 01** : Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties des plantes.
- Fig.02** : Montage cleavenger.
- Fig.03**: Entraînement à la vapeur.
- Fig.04** : Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des H.E.
- Fig.05** : Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des H.E.
- Fig.06** : Structure chimique de quelques composés aromatiques extraits des H.E.
- Fig.07** : Organigramme d'identification des huiles essentielles par CPG et CPG-SM.
- Fig.08** : Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.
- Fig.09** : Structures chimiques des antioxydants naturels.
- Fig.10**: Structure chimique du radical libre DPPH^{*} (2,2 DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle).
- Fig. 11**: Gram positif.
- Fig. 12**: Gram négatif.
- Fig.13** : Méthode de la diffusion en disque.
- Fig.14** : Aire de répartition naturelle des *Pinus*.
- Fig.15** : Arbre de *Pinus halepensis*.
- Fig.16** : Aiguilles et cônes de *Pinus halepensis*.
- Fig.17** : Arbre de *Pinus pinaster*.
- Fig.18** : Cône de *Pinus pinaster*.
- Fig.19** : Aiguilles de *Pinus pinaster*.
- Fig.20** : Fleurs de *Pinus pinea*.
- Fig.21** : Fruits de *Pinus pinea*.
- Fig.22** : Arbre de *Pinus pinea*.
- Fig.23** : Flavonoïdes des aiguilles de *P.halepensis*.
- Fig.24** : Composés phénoliques des aiguilles de *P.halepensis*
- Fig.25** : Quelques composés des huiles essentielles des aiguilles de *P.halepensis*.
- Fig. 26**: Montage d'hydrodistillation (Appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne).
- Fig.27**: Réaction du DPPH^{*} avec un antioxydant.
- Fig.28** : Méthode de FRAP.
- Fig. 29**: Composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *P. halepensis*.
- Fig. 30** : Pourcentage des principales classes de composé de *P.halepensis* en fonction de cycle végétatif.

Fig.31 : CHA des compositions chimiques de *P. halepensis* de l'ouest Algérien.

Fig.32: ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *P. halepensis*.

Fig.33 : Variation de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. halepensis* en fonction du temps de séchage.

Fig.34: Composés majoritaires identifiés dans différentes parties de *P. pinea*.

Fig.35 : Composés majoritaires identifiés dans *P.pinea* des différentes régions.

Fig.36 : CHA des compositions chimiques de *P. pinea* de l'ouest Algérien.

Fig.37 : ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *P. pinea*.

Fig.38 : Composés majoritaires identifiés dans *P. pinaster*.

Fig. 39: CHA des compositions chimiques de *P. pinaster* de l'ouest Algérien.

Fig.40 : ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *P.pinaster*.

Fig.41 : Diamètre d'inhibition de H.E de *P. pinaster* contre *Bacillus cereus*.

Fig.42 : Diamètre d'inhibition de H.E de *P. pinaster* contre *Staphylococcus aureus*.

Fig.43: Diamètre d'inhibition de H.E de *P. pinaster* contre *Candida albicans* ATCC 10231.

Fig.44: Diamètre d'inhibition de H.E de *P. pinaster* contre *Candida albicans* ATCC 26790.

Fig.45 : Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur du DPPH[•].

Fig. 46 : Pourcentage de réduction de DPPH[•] par l'H.E de *P.pinea* et de la vitamine C. en fonction du temps.

Fig. 47 : Pourcentage de réduction de DPPH[•] par l' H.E de *P.pinaster* et de la vitamine C. en fonction du temps.

Fig.48 : Absorbances en fonction des concentrations des huiles essentielles et de la vitamine C.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Position taxonomique de *Pinus halepensis* Mill.

Tableau 02 : Principaux composants des huiles essentielles du *P.halepensis*, *P.pinaster* et *P.pinea* des différentes origines signalées.

Tableau 03 : Etude bioclimatique des stations étudiées de *Pinus halepensis*

Tableau 04 : Etude bioclimatique des stations étudiées de *Pinus pinaster et pinea*.

Tableau 05 : Composition chimique des huiles essentielles des différentes parties de *Pinus halepensis*.

Tableau 06 : Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. halepensis* en fonction de son stade de développement.

Tableau 07 : Composition chimique des huiles essentielles de *P.halepensis* dans diverses localités de l'ouest Algérien.

Tableau 08 : Regroupement des échantillons de *P.halepensis* par l'analyse statistique

Tableau 09 : Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. halepensis* en fonction du temps de séchage.

Tableau 10 : Composition chimique des huiles essentielles de différentes parties de *P.pinea*.

Tableau 11 : Composition chimique des huiles essentielles de *P.pinea* cultivé dans diverses localités de l'ouest Algérien.

Tableau 12 : Regroupement des échantillons de *P.pinea* l'analyse statistique.

Tableau 13 : Composition chimique des huiles essentielles des différentes parties de *P.pinaster*.

Tableau 14 : Compositions chimiques des huiles essentielles de *P.pinaster* dans diverses localités de l'ouest Algérien.

Tableau 15 : Regroupement des échantillons de *P.pinaster* de l'analyse statistique.

Tableau 16 : Résultats de l'activité antimicrobienne utilisant la méthode de dilution.

Tableau 17 : Paramètres caractéristiques de la cinétique de la réduction.

Liste des histogrammes

Histogramme 01: Rendements en huile essentielle en fonction de la partie de la plante.

Histogramme 02 : Rendements en huile essentielle en fonction de la période de récolte.

Histogramme 03 : Rendements en huile essentielle en fonction du temps de séchage.

Histogramme 04 : Rendements des huiles essentielles des différentes parties de *P.pinea*.

Histogramme 05 : Rendements des huiles essentielles des différentes parties de *P.pinaster*.

Histogramme 06: Pourcentage des composés majoritaires des parties aériennes des trois *Pinus*.

Histogramme 07: Pourcentage des composés majoritaires des racines des trois *Pinus*.

Histogramme 08: Diamètres d'inhibition de H.E de la partie aérienne des trois *Pinus* contre les bactéries à Gram négatifs.

Histogramme 09: Diamètres d'inhibition de H.E de la partie aérienne des trois *Pinus* contre bactéries à Gram positifs.

Histogramme 10: Diamètres d'inhibition de H.E de la partie aérienne des trois *Pinus* contre *candida albicans*.

Histogramme 11 : Diamètres d'inhibition de H.E de la racine de trois *Pinus* contre les bactéries et les levures.

Introduction générale

Introduction générale

Depuis la préhistoire, l'être humain recherche dans son environnement (plantes, animaux, pierres, esprits) de quoi soulager ses maux et traiter ses blessures. La médecine moderne occidentale a rejeté la plupart de ces recours pour développer des médicaments chimiques et une technique de soins sophistiquée. Elle continue cependant d'utiliser certains remèdes à base des plantes médicinales. Une tendance récente conduit même à rechercher dans les plantes de nouveaux produits de substitution pour certaines maladies : cancer, paludisme... Plus de 200 000 espèces végétales sur les 300 000 recensées de nos jours sur l'ensemble de notre planète vivent dans les pays tropicaux d'Afrique. L'histoire de la médecine traditionnelle montre l'importance de ces espèces dans les thérapies, toutes les sociétés traditionnelles ayant puisé, pour leurs soins de santé, dans cette pharmacopée végétale d'une très grande richesse [1,2].

De nos jours de nombreux travaux consacrés à la chimie et à la toxicologie des plantes aromatiques et médicinales ont contribué à améliorer la connaissance scientifique dans ce domaine et à l'élaboration de protocoles standards de phytochimie et de screening biologique. Ces derniers ont tenu une place prépondérante dans l'art de guérir. Selon les cultures et les époques, elles ont été exploitées sous différentes formes, de diverses manières et pour les usages les plus variés [3]. 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, aussi à cause du coût élevé des produits pharmaceutiques de synthèse, la plupart des populations mondiales ne sont pas en mesure de s'offrir les soins de santé modernes, et c'est pourquoi elles se tournent vers la médecine populaire et les plantes médicinales, ou simples, pour se soigner [4-8].

L'Algérie, par sa vaste étendue terrestre du nord au sud et de l'est à l'ouest, et par sa variation climatique, possède une flore abondante, riche et variée dans laquelle il a été dénombré de nombreuses espèces aromatiques susceptibles de fournir des huiles essentielles [9]. L'étude de ces dernières est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. L'histoire de l'aromathérapie naquit ainsi et, avec les progrès de la science, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des plantes aromatiques et médicinales d'authentiques médicaments [10,11].

Dans le cadre de ce travail, nous proposons, d'analyser et de relier les informations chimiques et biologiques, dans des populations végétales de *Pinus halepensis*, *Pinus pinea* et *Pinus pinaster*, poussant à l'état spontané à Tlemcen (Algérie). La variabilité chimique de la fraction volatile, en quantité et en composition, pourrait être le reflet soit de différences environnementales, soit de différences biologiques entre populations ou bien une combinaison des deux facteurs.

La finalité de ce travail est de tenter de répondre aux deux questions suivantes :

- ✚ La localisation géographique a-t-elle une influence sur les caractéristiques chimiques?
- ✚ La composition chimique peut elle influencer sur l'activité biologique?

La valorisation de cette étude est envisagée selon plusieurs axes parmi lesquels :

- ✓ D'un point de vue chimique :

L'extraction des H.E de trois *Pinus*, son analyse et sa caractérisation chimique par deux méthodes chromatographiques CPG et CPG/SM. Ce travail vise à étudier aussi les variations intra et interspécifiques dans la composition chimique en volatils et, ce faisant, permettra la mise en évidence d'éventuelles spécificités micro-régionales.

- ✓ D'un point de vue biologique :

L'étude chimique sera poursuivie par la détermination des activités antimicrobienne et anti-oxydante des essences étudiées.

Notre travail comporte deux parties :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique, cette partie de thèse est composée de trois chapitres principaux :

- ❖ Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons commencé par l'étude des huiles essentielles.
- ❖ Au cours du deuxième chapitre nous avons évoqué l'étude du pouvoir antimicrobien et antioxydant. Cette dernière résume la méthodologie suivie lors de l'évaluation des propriétés pharmacologiques d'un principe actif extrait de plante.
- ❖ Le troisième chapitre portera sur une étude bibliographique sur la description botanique des trois espèces et les travaux dont elles ont fait l'objet.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous présenterons le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude et les résultats obtenus.

Le travail expérimental se déroule selon deux axes :

Dans le premier axe, nous avons réalisé l'extraction des huiles essentielles des organes différents des trois espèces. Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à évaluer le

pouvoir antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles issues des plantes par différentes techniques.

En conclusion, nous avons énuméré les résultats obtenus à travers cette étude chimique des constituants de ces trois plantes.

La contribution des laboratoires suivants a énormément aidé à la réalisation de ce modeste travail:

- ✓ Laboratoire de Substances Naturelles et 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 Antibiotique, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (**LAPSAB**) - Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou-Bekr-Belkaïd, Tlemcen.

REFERENCES

- [1] **Sofowara A.**, Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed. Karthala, **2010**, p.5.
- [2] **Roulier G.**, Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes, Ed. Dangles, France, **1992**.
- [3] **Bassene E.**, Initiation à la recherche sur les substances naturelles : Extraction- Analyse- Essais Biologiques, Presses universitaires de Dakkr, **2012**, p.10, **ISBN 2-913184-74-2**.
- [4] **Larousse**, Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, Préparation, Soins, **2001**, p.9-10.
- [5] **Small E.**, Catling P.M., Les cultures médicinales canadiennes, NRC Research Press, **2000**, p.2.
- [6] **Garreta R.**, Des simples à l'essentiel: De l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales, Presses Universitaire du Mirail, **2007**, p.1.
- [7] **Boisvert C.**, Plantes et remèdes naturels, Ed. Aubanel, **2003**, p.20.
- [8] **Girre L.**, Les plantes et les médicaments, L'origine végétale de nos médicaments, Ed. Paris. **2006**, p.1.
- [9] **Belouad A.**, « Plantes médicinales d'Algérie », Office des Publications Universitaires, Alger, **2001**, p. 5-10.
- [10] **Bruneton J.**, « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales », Ed. Tec & Doc, Paris, **1999**, p.483-560.
- [11] **Buronzo A.M.**, Grand guide des huiles essentielles : santé, beauté, bien-être, HACHETTE pratique, **2008**, p .14.

Chapitre I

CHAPITRE I : Chimie des huiles essentielles

I.1 Introduction

Les plantes de façon générale et aromatiques en particulier, se caractérisent par deux types de métabolismes : primaire fournit les constituants de base en quantité élevée. Les plus importants sont les sucres et leurs dérivés, les lipides et les protéines. Le métabolisme secondaire produit des métabolites en faible quantité, mais dont les applications dans différents domaines, en particulier à intérêt pharmaceutique et cosmétique, voir nutritionnel, sont de la plus grande importance. Les huiles essentielles ou essences, font partie de ce groupe de métabolite avec les alcaloïdes et les phénols.

I.2 Bref historique

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales «P.A.M.» est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles H.E datent de l'an 3000 avant J.C [1]. Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses.

En Egypte, l'utilisation de baumes et résines aromatiques remonte à l'époque des pharaons : embaumement, momification et divers autres usages. Les grands prêtres et médecins égyptiens ont transcrit leurs connaissances sur des papyrus et leur savoir, a constitué le fondement de l'aromathérapie. Les connaissances égyptiennes ont été diffusées par les médecins grecs de la Rome Antique et par Hippocrate.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques [2].

Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante. En 1928 le chimiste français René-Maurice Gatte fosse a utilisé le terme aromathérapie pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a

découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main. En 1964 le docteur français Jean Valunet a connu du succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie. Aujourd'hui, nous reconnaissons que les huiles essentielles ont des effets pharmacologiques, psychologiques et physiologiques sur l'homme [3-6].

I.3 Qu'est-ce qu'une huile essentielle ?

Une huile essentielle (H.E) peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour alchimiste. Dans la réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit parfumé et volatil, composé de molécules sécrétées par certains arbres et certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique. Le terme « volatil » s'explique par le fait que les huiles essentielles s'évaporent très rapidement. C'est pourquoi il est nécessaire de les conserver correctement afin qu'elles gardent intacts leurs principes actifs [6-8].

I.4 Localisation des huiles essentielles

Les H.Es n'existent quasiment, que dans les végétaux, elles peuvent être stockées dans tous les organes des plantes aromatiques (**Fig. 01**) [2, 9-13].

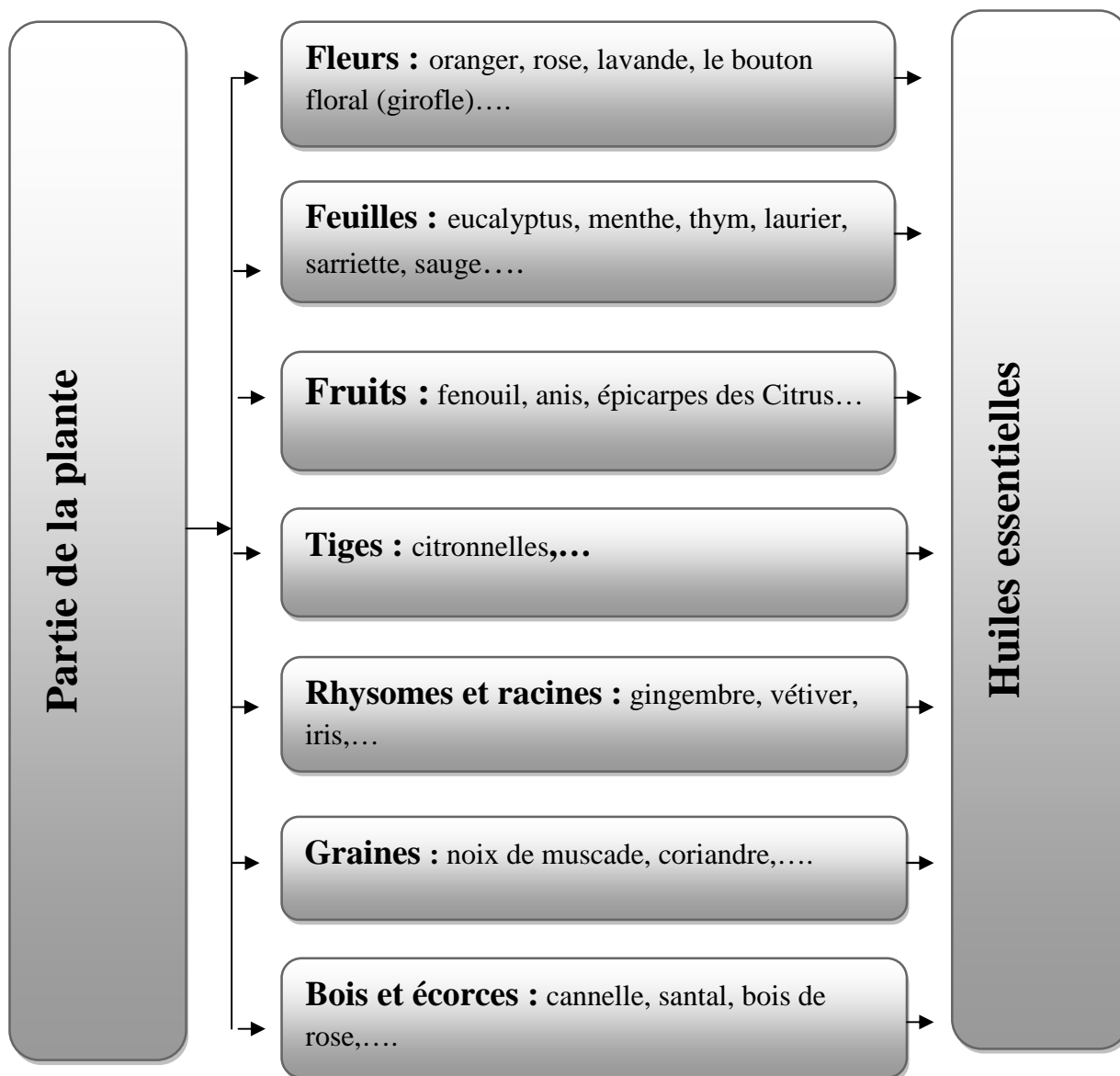


Fig.01 : Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties de plantes.

I.5 Rôle des huiles essentielles pour le règne végétal

Nous ne savons pas exactement ce que représentent les H.Es pour le règne végétal. Les plantes les utilisent pour se protéger contre les virus et tous pensent qu'il s'agit d'hormones végétales. D'autres considèrent que les huiles sont des messagers entre sorte de parasites et de microbes [14] (des travaux ont montré que les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent jouer des rôles importants dans la relation des plantes avec leur environnement. Par exemple, le 1,8-cinéole et le camphre inhibent la germination des organes infectés ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes) [15, 16]

I.6 Facteurs de variabilité des Huiles essentielles

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce, ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes. Le mot chémotype est dérivé de chimiotype ou chimiovariété. Cette variation peut être due à des nombreux facteurs, dont nous citons les plus importants :

I.6.1 Origine botanique

La composition d'une H.E varie en fonction de l'espèce productrice. En effet, l'extraction de l'H.E d'un même organe de deux plantes différentes ne donne pas la même composition chimique [17,18], par exemple deux espèces de sauge : la sauge officinale (*Salvia officinalis*) et la sauge sclarée (*Salvia sclarea*), qui peuvent être vendues toutes les deux sous l'appellation d'essence de sauge. La première, riche en cétones neurotoxiques, peut provoquer des crises d'épilepsie, alors que la seconde possède des esters aromatiques anti-épileptisants [19].

I.6.2 L'organe producteur

La composition et le rendement d'une H.E varient selon la partie de la plante à partir de laquelle est extraite [20].

I.6.3 Origine géographique

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue. Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine.

Une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes [21]. Par exemple, le thym vulgaire à géraniol ne produit cette molécule de géraniol qu'en hiver alors que l'acétate de géranyl la remplacera en été [22].

I.6.4 Conservation des plantes

Les plantes doivent être séchées à l'air et à l'ombre. En effet, des modifications chimiques, physiques et biochimiques dues à l'action de la lumière et de la température peuvent influencer sur la qualité d'huile [20].

I.6.5 Le mode d'extraction

Il existe plusieurs modes d'extraction des huiles essentielles qui peuvent faire évoluer la composition de l'H.E.

I.7 De la plante à l'huile essentielle

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction des H.E :

I.7.1 Par distillation

Deux méthodes sont décrites ci-dessous :

- La méthode de Moritz : il s'agit d'une hydrodistillation simple qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau. L'ensemble est, ensuite, porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile se sépare par différence de densité.

L'hydrodistillation peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Ce recyclage est dit cohobage et le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger (**Fig.02**). Son intérêt majeur réside dans l'utilisation du système de cohobation permettant une distillation en continu sans modifier la quantité en eau du ballon.

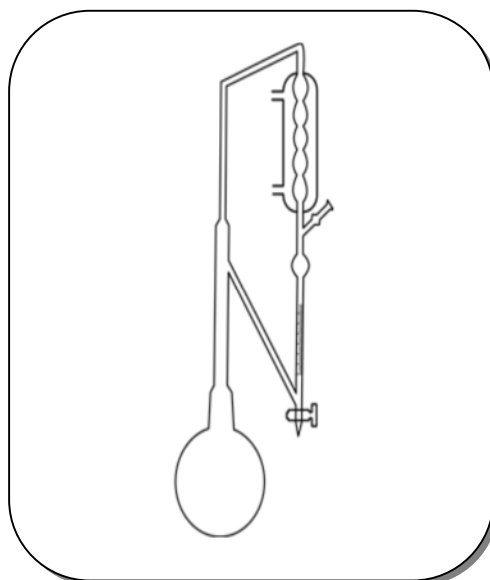


Fig.02 : Montage Clevenger.

La méthode de Parnas-Wagner : dans la distillation à vapeur saturée, la matière végétale est placée sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic et n'est pas en contact avec l'eau. Les

principes volatils sont entraînés par les vapeurs d'eau puis refroidis et enfin séparés de la phase par décantation [7, 5].

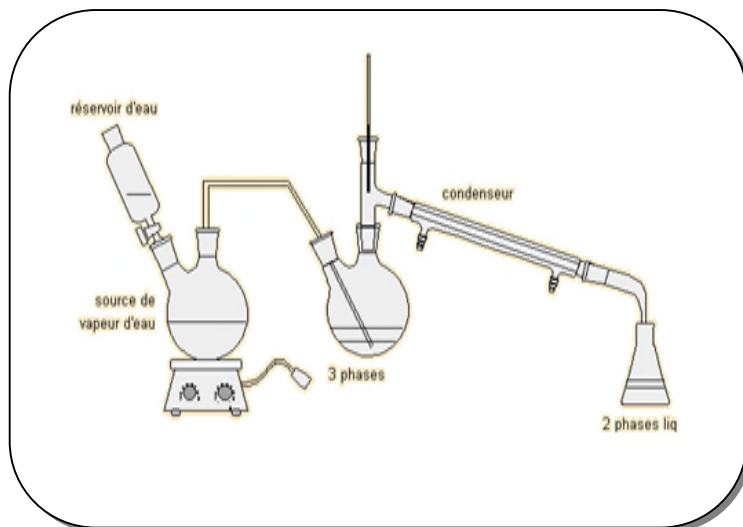


Fig.03 : Entraînement à la vapeur.

1.7.2 Par enfleurage

C'est une méthode plus guère utilisée, car trop complexe sauf pour les fleurs principalement. Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques grasses qui absorberont tout le parfum. Les corps gras vont, ensuite, être épuisés par un solvant. Une fois l'arôme des fleurs absorbé, nous remettons des fleurs fraîches, et ceci jusqu'à saturation du corps gras. Au bout de 24 heures, le corps gras et les H.E sont séparés [7].

1.7.3 Extraction au CO₂ supercritique

Dans cette technique, un courant de CO₂ à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraîne les H.E qui seront, ensuite, récupérées [9].

1.7.4 Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

Le montage obtenu se rapproche sensiblement d'un montage d'hydrodistillation classique. Le réacteur contenant seulement le matériel végétal est chauffé par les micro-ondes à l'intérieur du four, les vapeurs sont ensuite entraînées dans le col de cygne avant d'être condensées dans le réfrigérant puis recueillies dans un essencier. Les graines sont en permanence humides, ce qui ne laisse aucune chance à la réalisation d'éventuelles réactions secondaires, néfastes à la qualité du produit obtenu [23].

Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes s'articule autour de trois points importants :

- ✓ La quantité de matière végétale traitée,
- ✓ La puissance micro-ondes appliquée,
- ✓ La durée totale de l'extraction.

I.8 Composition des huiles essentielles

I.8.1 Origine biogénique des huiles essentielles

Comme toutes les plantes sont classées en familles, les produits naturels sont aussi classés en deux familles. Les majeures parties des composés des huiles essentielles sont : le groupe des terpénoïdes d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényle propane d'autre part.

❖ Groupe des terpénoïdes

C'est le groupe le plus important. Il comprend des monoterpènes (10 atomes de carbone dans carbone), des sesquiterpènes (20 atomes de carbone), des diterpènes (30 atomes de carbone).... Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de 5 atomes de carbone de formule générale $[C_5H_8]_n$. La molécule de base est l'isoprène. Ce dernier, sous sa forme réactive est l'isoprénol pyrophosphate **IPP** qui se transforme en diméthylallyl pyrophosphate **DMAPP**. Les composés IPP et DMAPP réagissent ensemble pour former le géranyl pyrophosphate **GPP**, précurseur des monoterpènes en C_{10} . On trouve dans la nature plus de 900 composés.

Une deuxième molécule d'IPP réagissant sur le GPP, fournit farnésyl pyrophosphate **FPP**, précurseur des sesquiterpènes en C_{15} , puis une troisième molécule d'IPP réagissant sur **FPP** fournit le géranylgeranyl pyrophosphate **GGPP**, précurseur des diterpènes en C_{20} . Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines, ainsi que dans les champignons. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cycliques [24, 25].

▪ Les monoterpènes :

Ce sont des hydrocarbures aliphatiques, saturés ou insaturés. Ils peuvent être acycliques comme le myrcènes, ocymène..., ou cycliques comme le pinène, camphène..., et même aromatiques comme le p-cymène, aussi, ils peuvent contenir des atomes d'oxygènes (**Fig.04**).

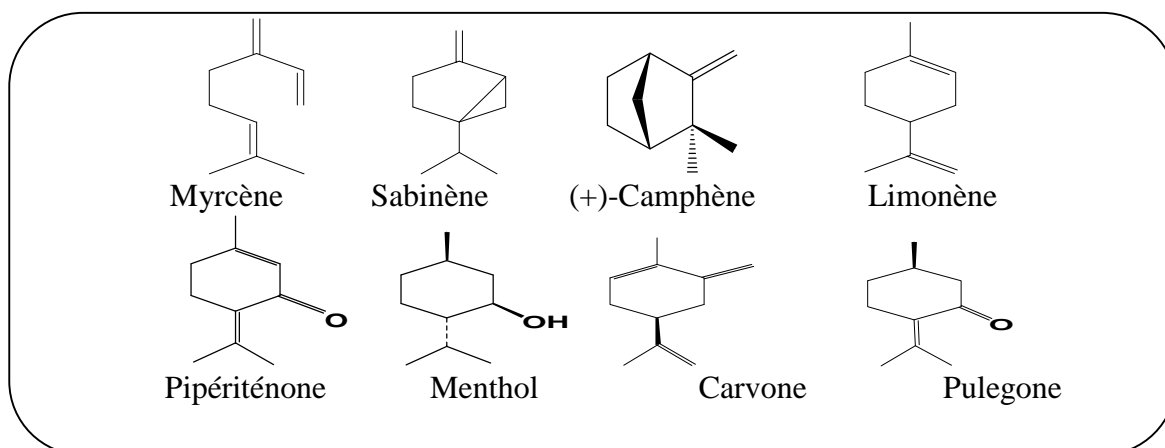


Fig.04 : Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des H.E.

▪ **Les sesquiterpènes : [26]**

Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent carbures, alcools, cétones étant les plus fréquents. On trouvera ci-dessous quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des H.E (**Fig.05**).

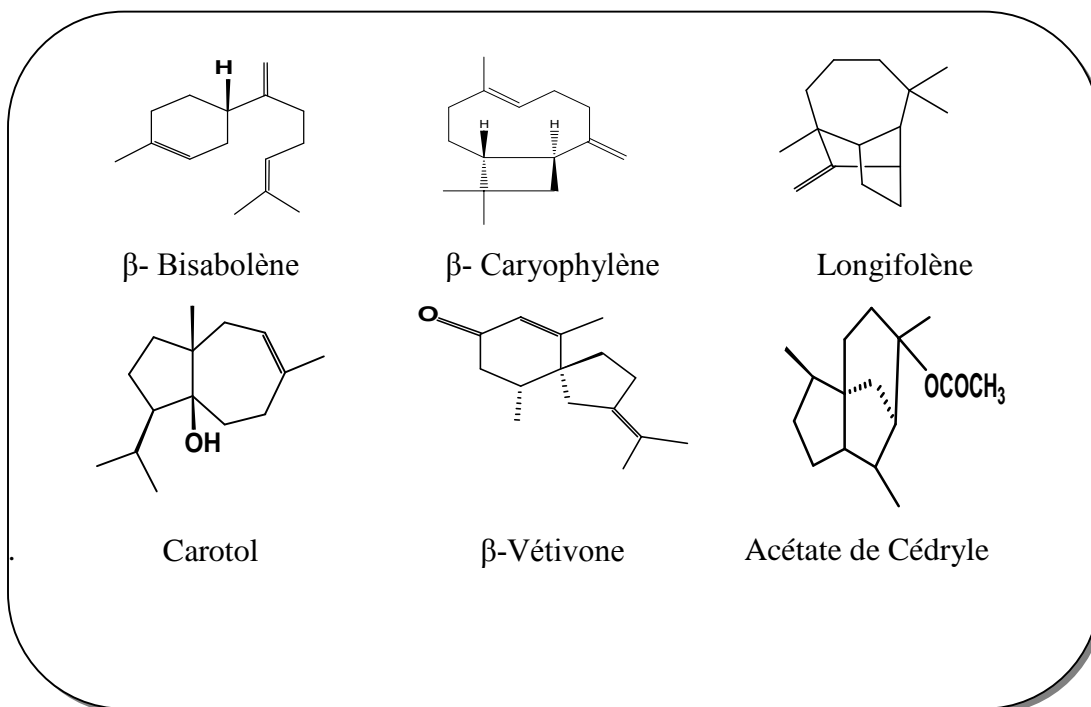


Fig.05 : Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des H.E.

Les dérivés aromatiques des huiles essentielles sont surtout des dérivés de l'acide cinnamique (C₆-C₃), celui-ci provient de l'acide shikimique obtenue à partir du phospho-énol-pyruvate et du D-rythrose-4-phosphate [27].

I.8.2 Les phénylpropanes (composés aromatiques)

Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'*Apiaceae* (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc. (Fig.06) [9, 28].

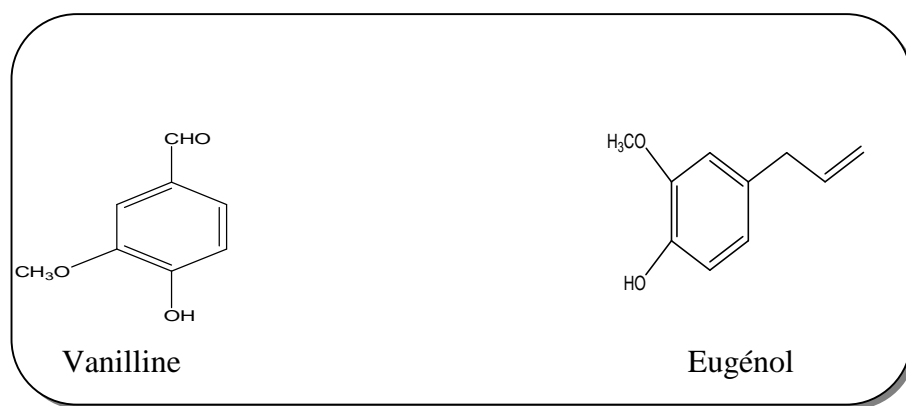


Fig. 06: Structure chimique de quelques composés aromatiques extraits des H.E.

I.9 Méthodes d'analyses des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont considérées comme une matière première destinée à divers secteurs d'activités tels que la parfumerie, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique et de l'agroalimentaire, d'où la connaissance de la composition chimique reste une étape importante et nécessaire.

L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes nous parlons sur les méthodes micro analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces. Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques.

I.9.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt [29]. La technique a été

perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés [30, 31]. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules [9, 32].

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou à plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) [33]. Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes. Les indices de rétention sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire de Corse et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse CPG/SM.

1.9.2 Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM.

Les spectres de masse obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles, commerciales (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library [34], Wiley Registry of Mass Spectral Data [35], contenant plusieurs milliers de spectres, König-Joulain, intitulée « Terpenoids and Related Constituents of

Essential Oils » contenant plus de 1200 composés) ou construite au laboratoire. Ainsi une bibliothèque nommée « Arômes » a été construite par nos soins. Elle contient près de 500 spectres de composés essentiellement terpéniques. Les spectres de masse expérimentaux peuvent aussi, si besoin, être comparés à des spectres contenus dans des bibliothèques non informatisées (**Fig.07**) [36-39]. Lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus dans les bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatoires telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparatoire (CGP). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-¹H) et du carbone-13 (RMN-¹³C), SM, IRTF,... [40].

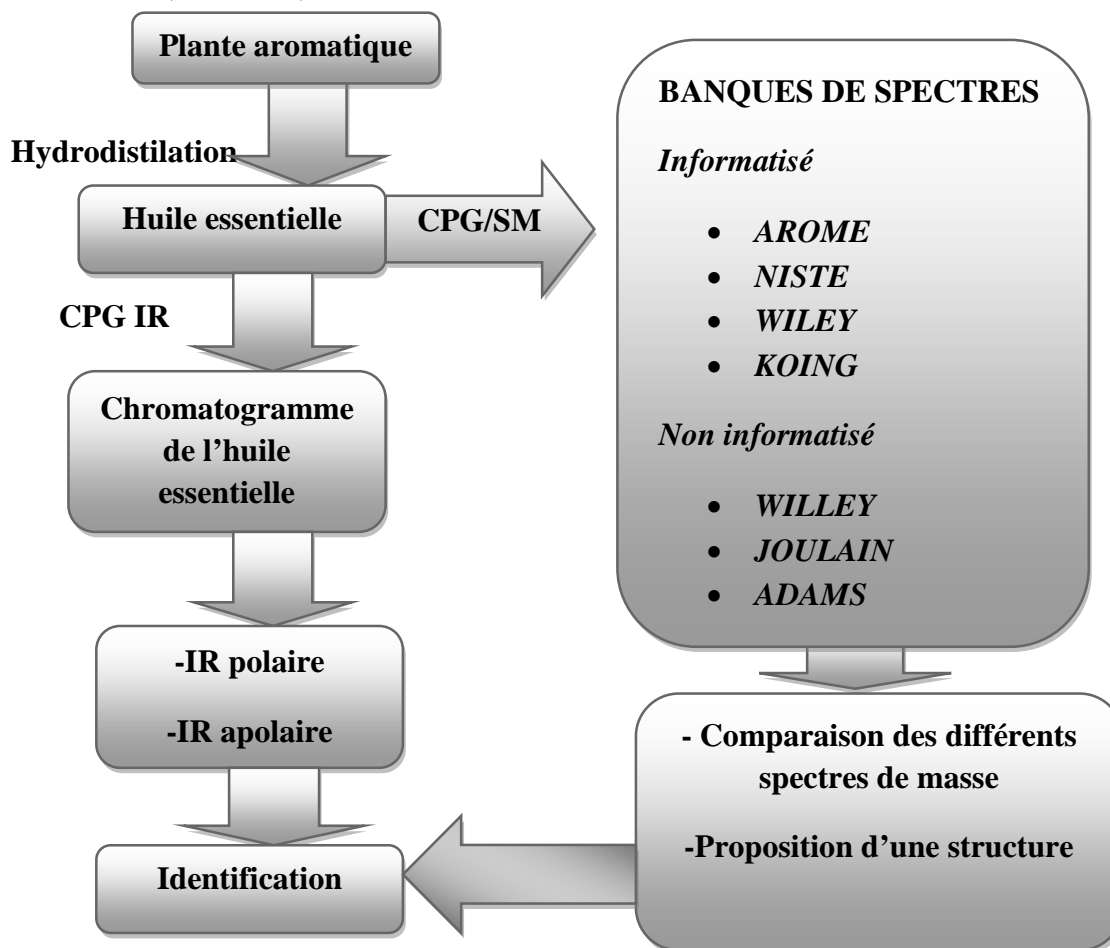


Fig.07 : Organigramme d'identification des huiles essentielles par CPG et CPG-SM.

I.10 Action biologique, effets thérapeutiques

Depuis des millénaires, les huiles essentielles sont employées pour guérir et prévenir les maladies. Hommes et femmes ont pu constater, de manière empirique dans un premier temps et scientifique plus tard, l'efficacité de ces petites gouttes. A mesure que les études, les expériences et les témoignages s'accumulaient, des principes communs se sont dessinés [5,6]. De nombreuses études ont montré que l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires [41] et les effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant [42].

La description de quelques principales propriétés thérapeutiques observées lors de l'utilisation des huiles essentielles sont :

❖ Des propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques

Plusieurs études ont montré que les huiles essentielles sont capables de s'attaquer aux microbes les plus puissants, comme le staphylocoque, le bacille de Koch (tuberculose) ou le bacille typhique (typhoïde). Les huiles essentielles ont une double action contre les microbes : elles peuvent les tuer (effet bactéricide) et elles en arrêtent la prolifération (effet bactériostatique).

❖ Des propriétés antivirales

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques contenues dans les huiles essentielles, ce qui confère à ces dernières la capacité de combattre certaines pathologies virales. Les huiles essentielles arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination du mucus tout en stimulant le système immunitaire.

❖ Des propriétés anti-inflammatoires

Les aldéhydes contenus dans un grand nombre d'huiles essentielles ont la propriété de combattre les inflammations. Un cas exemplaire est celui des huiles essentielles de clou de girofle qui calme les douleurs dentaires.

❖ Des propriétés cicatrisantes

Les huiles essentielles présentent des propriétés cicatrisantes reconnues depuis l'antiquité et utilisées en temps de guerre pour soigner les blessés. En effet, elles ont le pouvoir de régénérer les tissus qui ont été abimés et de favoriser la cicatrisation des blessures.

❖ Des propriétés circulatoires

Un grand nombre d'huiles essentielles sont de puissants soutiens pour notre système circulatoire. Elles ont la capacité d'activer la circulation sanguine, de réduire les hémorroïdes et de soulager les jambes lourdes. Parmi les huiles essentielles qui ont une action circulatoire, nous retrouvons : les huiles de citron, de genièvre, de menthe poivrée et sauge.

❖ Des propriétés digestives

Les huiles essentielles ont une action manifeste sur le système digestif. Elles sont efficaces contre la formation de gaz au niveau abdominal (huiles essentielles de basilic, d'anis) et elles favorisent la formation des sucs gastriques nécessaires à une bonne digestion (huiles essentielles de cumin, d'estragon, de menthe poivrée).

❖ Des propriétés antiparasitaires

Les huiles essentielles de quelques plantes aromatiques comme le géranium, la citronnelle, la menthe et la lavande sont efficaces pour protéger des attaques des insectes, en particulier des moustiques.

❖ Des propriétés de régulation métabolique

Les huiles essentielles ont la capacité de réguler l'action de nos glandes. Les mécanismes subtils et délicats mis en jeu par ces dernières étant véritablement complexes, il vaut toujours mieux demander les conseils d'un expert en aromathérapie.

❖ Des propriétés antispasmodiques

Les huiles essentielles de marjolaine, de lavande peuvent arrêter les spasmes, c'est-à-dire les contractions qui se manifestent de façons involontaires dans le corps, aussi bien au niveau rénal qu'au niveau des viscères.

❖ Des propriétés désodorisantes et purifiantes

A la maison, les huiles essentielles diffusées régulièrement dans l'atmosphère parfument et assainissent l'air que nous respirons.

I.11 Utilisation des huiles essentielles

Les H.Es s'utilisent selon différentes voies. Nous pouvons les avaler, les respirer ou les utiliser en application directes sur la peau :

✓ **La voie orale**

Elle doit être utilisée uniquement sur conseils du médecin aromathérapeute. Nous conseillons de ne jamais prendre une huile pure dans la bouche sous peine de désagréments qui peuvent aller jusqu'à la brûlure. Aussi, il ne faut jamais prendre plus de trois gouttes [43,44].

✓ **La voie respiratoire**

Les H.Es sont, très vite, absorbées par toutes les petites cellules ciliaires qui tapissent notre arbre respiratoire depuis les fosses nasales jusqu'au bout de nos alvéoles pulmonaires.

✓ **La voie cutanée**

C'est la voie idéale car efficace et sans danger. Généralement, les huiles sont utilisées à des concentrations très diluées (trois gouttes dans une cuillerée à café). Nous pouvons les employer pour massage ou simplement en application selon la zone et l'affection à traiter. D'autres formes sont aussi possibles : pommades, bain, etc. [45].

Dans tous les cas, les H.E pénètrent dans notre corps pour atteindre la circulation sanguine afin d'être acheminées jusqu'au site malade [46].

I.12 Toxicité des huiles essentielles

Dans le monde actuel des produits naturels, il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive. Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires, parce que l'efficacité et la toxicité ce n'est souvent qu'une question de quantité [9,46]. Il convient d'ailleurs de relativiser ce risque car il concerne essentiellement les personnes fragiles, notamment les bébés et les enfants, les personnes âgées et les femmes enceintes ou allaitantes. La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques pour lesquelles des risques ont été identifiés suite à des tests. Une famille biochimique particulière, celle des cétones, est ici particulièrement visée : elle présente une neurotoxicité et un risque abortif.

- ❖ Pour une autre famille, celle des phénols, sa causticité sera particulièrement tournée vers la peau (dermocausticité) et le foie (hépatotoxicité). Ces huiles essentielles à phénols ne s'utiliseront donc pas ni par voie cutanée ni par voie rectale, seule la prise orale sera possible. En cas de traitement long, pour éviter tout risque hépatotoxique, il faudra observer une fenêtre thérapeutique.
- ❖ Une autre toxicité provient des HE contenant des furocoumarines et pyrocoumarines.

Leur application cutanée, ou même leur prise par voie orale, peut provoquer, sous l'effet prolongé du soleil, des réactions érythémateuses susceptibles de favoriser la carcinogénèse et l'accélération de la mélanogénèse.

Enfin, l'absorption orale d'huiles essentielles riches en monoterpènes (toutes les espèces de pins et de sapins, de genévriers et même le santal blanc) sur de longues périodes peut enflammer et détériorer à terme, les néphrons (les unités fonctionnelles du rein). C'est ce que l'on nomme une néphrotoxicité [25, 47].

Lorsque tous ces effets toxiques sont présents à l'esprit, avoir recours aux huiles essentielles en parfaite innocuité n'est qu'une question de choix : celui de l'huile, de la dose, de la durée et de la voie d'administration. Comme pour un médicament, il existe pour chaque huile essentielle un équilibre entre le bénéfice et le risque qui doit aussi être envisagé en fonction du sujet.

REFERENCES

- [1] **Baser K.H.C.**, Buchbauer G., Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications, Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, **2010**, p. 994.
- [2] **Festy D.**, 100 Réflexes AROMATHERAPIE : Je me soigne avec les huiles essentielles, Pratiques Efficaces et Faciles, Ed Leduc. S, **2008**, p. 6-20.
- [3] **René Maurice G.**, « Aromathérapie- Les huiles essentielles hormones végétales », Librairie des sciences, Giradot &Compagnie, Paris, **1937**.
- [4] **Kaloustian J.**, Hadji- Minaglou F., La connaissance des huiles essentielles : entre sciences et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer-verlag France, Paris, **2012**, p. 5-10
- [5] **Fabrocini V&C.**, Comment se soigner avec L'AROMATHERAPIE et guérir : agitation, anxiété, allergie, asthme, déprime, insomnie, lombalgie, mal de dos, migraines, palpitations, etc. Ed. de vecchi, **2007**, p. 4-17.
- [6] **Besombes C.**, Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, **2008**, p.289.
- [7] **Moro - Buronzo A.**, Grand guide des huiles essentielles : Santé, Beauté, Bien- Etre, HACHETTE pratique, **2008**, p.14.
- [8] **Belaiche P.**, Traité de la phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1, l'aromatogramme, **1979**, p. 135-147, ISBN 2-224-00520-2.
- [9] **Scimeca D.**, Les plantes du bonheur, Ed. Alpen, **2007**, p.12-17.
- [10] **Bruneton J.**, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} édition, Ed. Tec & doc, **1999**, p. 625-910, ISBN : 2-7430-0315-4.
- [11] **Franz C.**, Novak J., Sources of essential oils. In: Bas, Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2010**, p.39–82.

- [12] **Bakkali F.**, Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46, 446–475.
- [13] **Teixeira B.**, Marques A., Ramos C., Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, **2013**, 43: 587– 595.
- [14] **Willem J.P.**, 60 maux soignés par les huiles essentielles : l'aromathérapie au quotidien pour toute la famille, Les minipockets de santé, **2009**, p.7-17.
- [15] **Holley A.**, Eloge de l'odorat, Ed. Odile Jacob, **1999**, p. 276.
- [16] **Nicholas H. J.**, Phytochemistry Organic Metabolites, Yonkers, New York, Vol. 2, **1973**.
- [17] **Martinetti P.**, Mon guide des huiles essentielles, Ed. Lanore, **2013**, p.5-6, ISBN : 978285157733.
- [18] **Padrini F.**, Leucheroni M., La nature des huiles essentielles, Ed. Dexechi, **1997**, p.124.
- [19] **Franchomme P.**, Jollois R., L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles, Ed. Jollois, **2001**.
- [20] **Roulier G.**, Les huiles essentielles pour votre santé, Ed. Dangles, **2000**, p.336.
- [21] **Joy Bowes E.**, The chemistry of Aromatherapeutic Oils, 3rd Edition, **2003**, p. 56.
- [22] **Viaud H.**, Les huiles essentielles et leur distillation. Thérapeutique naturelle, **1993**, p.924.
- [23] **Lucchesi M.E.**, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à L'extraction des Huiles Essentielles Thèse de Doctorat, Décembre **2006**, p. 16-59.
- [24] **Modzelewska A.**, Sur S., Kumar K.S., Khan S.R., Sesquiterpenes : Natural products that decrease cancer growth. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, **2005**, 5: 477-499.
- [25] **Kaloustian J.**, Hadji-Minaglou F., La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer- verlag France, Paris, **2012**, p. 17,160, ISBN : 978-28178-0308.
- [26] **Azevedo N.R.**, Campos I.F., Fereira H.D., Prtes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C., Paula J.R., Ferri P.H., Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochem*, **2001**, 57(5) : 733-736.

- [27] **Basséne E.**, Initiation à la recherche sur les substances naturelles : Extraction-Analyse-Essais Biologiques, Presses universitaires de DAKAR, **2012**, p. 56-60, **ISBN** : 2-912184-74-X
- [28] **Bruneton J.**, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 4^{ème} édition Tec & doc, **2009**, p.567-592, **ISBN** : 978-2-7430-1188-8.
- [29] **Rouessac F.**, Rouessac A., Brooks S., Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. John Wiley and Sons, **2007**, p.31.
- [30] **Cserhati T.**, Forgacs E., Chromatography in food science and technology, CRC Press, **1999**, p.1
- [31] **Mendham J.**, Vogel A.I, Denny R.C., Toullec J., Barnes J., Barnes J.D., Mottet M.,Tomas M.J.K., Analyse chimique quantitative de Vogel, Ed. De Boeck Université, **2005**, p.231-314.
- [32] **Burgot G.**, Burgot J. L., Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques, 3^{ème} Edition Tec & Doc Lavoisier, **2011**, p.10, **ISBN** : 978-2-7430-1337-0.
- [33] **Kováts E.**, Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System, in *Advances in Chromatography*, Chap. 7, **1965**, 229- 247.
- [34] **National Institute of Standards and Technology**, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, the Perkin Elmer Corporation, **1999**.
- [35] **Lafferty M.C.**, Stauffer D.B., Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed.Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10 d. Palisade Co., Newfield, **1994**.
- [36] **Joulain D.**, König WA.,The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, E. B.-Verlag, Hamburg, **1998**.
- [37] **Adams R.P.**, Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press, Inc., San Diego, **1989**.
- [38] **Adams R.P.**, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, **1995**.
- [39] **Lafferty M.C.**, Stauffer D.B., The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, **1-7**, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, **1989**.

- [40] **Paolini J.**, Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE ET IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéracées endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*, Thèse de doctorat, Université de Corse **2005**, p.26, 38.
- [41] **Lahlou M.**, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, **2004**, 18: 435-448.
- [42] **Pibiri M.C.**, Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, **2006**, p. 28-52.
- [43] **Scimeca D.**, Les plantes du bonheur, Ed. Alpen, **2006**, p. 17.
- [44] **Garreta R.**, Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales, Presses Université, **2007**, p.308-312.
- [45] **Scimeca D.**, Tétou M., Votre santé par les huiles essentielles : Le guide pratique pour prévenir et guérir tous les maux quotidiennes, les huiles essentielles pour le corps et l'esprit, leur mode d'utilisation, les meilleures associations, Ed. Alpen, **2005**, p.24-26.
- [46] **Festy D.**, Les huiles essentielles ça marche ! Avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S EDITION, **2011**, p. 22-26, ISBN : 978-2- 84899-316-4
- [47] **Festy D.**, Je ne sais pas utiliser les huiles essentielles : Découvrir l'aromathérapie, le guide pour se soigner facilement et sans risque, Ed. Leduc. S, **2012**, p. 92.

Chapitre II

CHAPITRE II : Pouvoir antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles

II.1 Introduction

Les substances naturelles sont des composés que l'on retrouve dans les organismes végétaux, l'étude de ces composés et leur isolement a permis des progrès dans plusieurs domaines, particulièrement dans le domaine de la santé humaine et animale. En effet les plantes renferment des composés qui ont la propriété d'agir sur l'organisme humain, favorablement (cas des médicaments) ou défavorablement (cas des toxines). A travers ce chapitre, nous allons présenter deux activités biologiques importantes qui sont :

II.2 Activité antioxydante

Le terme antioxydant était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIX^e siècle et au début du XX^e siècle les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire par exemple la corrosion des métaux et la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion [1,2].

Ces dernières années de nombreuses études ont apporté des précisions sur les niveaux des consommations des antioxydants, leur devenir dans l'organisme et leurs mécanismes d'action aux niveaux cellulaire et moléculaire. Par ailleurs, de nombreuses molécules antioxydantes d'origine naturelle suscitent actuellement l'intérêt professionnel de l'agroalimentaire et génèrent de nouveaux programmes de recherches [1,3].

II.2.1 Radicaux libres et stress oxydatif

L'oxygène est un élément vital qui joue un rôle indispensable dans l'oxydation des cellules. Lorsque cette oxydation est incomplète, il se forme des molécules nocives appelées radicaux libres. En grand nombre, les radicaux libres altèrent l'intégrité des cellules et provoquent une mort cellulaire prématurée. La principale production des radicaux libres à l'intérieur de l'organisme est le métabolisme, c'est-à-dire la transformation des aliments en énergie. Les sources externes sont le stress, le tabac, l'alcool, la pollution et les additifs alimentaires. Si les radicaux libres en viennent à excéder la capacité de l'organisme à les neutraliser, ils peuvent contribuer à l'apparition de plusieurs maladies, dont les maladies cardiovasculaires, certains types de cancers et d'autres maladies associées au vieillissement [4-6].

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses antioxydantes [7].

II.2.2 Activité antioxydante et les antioxydants

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) [8].

Les antioxydants sont des molécules qui aident le corps à lutter contre les radicaux libres en les neutralisant, afin qu'ils deviennent inoffensifs [9], ils peuvent être classés en deux groupes selon le niveau de leur action : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires.

❖ Les antioxydants primaires

Ils sont appelés également les antioxydants vrais ou antioxydants radicalaires, sont des molécules (notées AH) capables d'interrompre la chaîne auto catalytique de l'oxydation en bloquant les radicaux lipidiques R^\bullet et ROO^\bullet par transfert d'un atome d'hydrogène pour reformer RH et ROOH. De la même manière, ils peuvent transformer les radicaux RO^\bullet en ROH, bloquant ainsi la formation des aldéhydes [1].

❖ Les antioxydants secondaires

Ils sont appelés aussi préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des molécules exogènes ; des substances décomposant les hydro-péroxydes en alcools, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou des disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV [10], Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes [11].

II.2.3 Les sources des antioxydants

❖ Sources synthétiques

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyper-lipoprotéïnémiques, les β -bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes (**Fig.08**) [7].

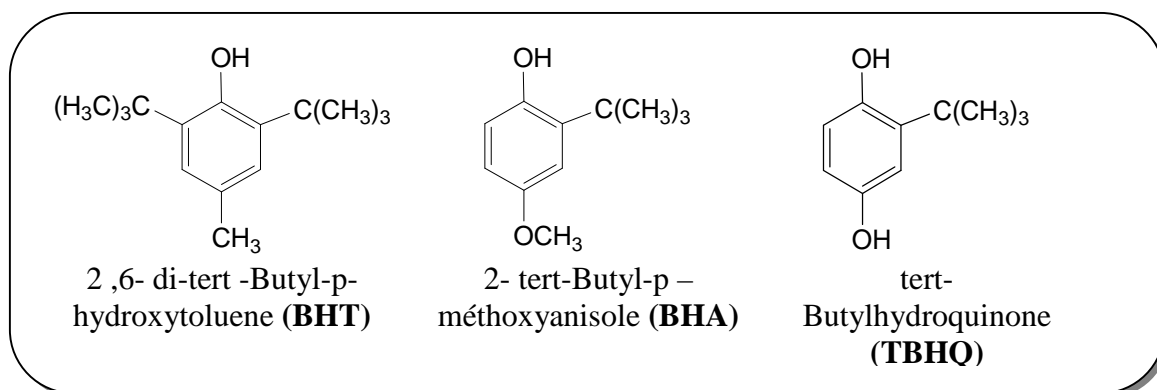


Fig.08 : Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.

❖ Sources naturelles

Les antioxydants d'origine alimentaire sont nombreux, certains sont liposolubles comme : tocophérols ; β carotène ; lycopène, d'autres sont hydrosolubles comme l'acide ascorbique ; et d'autre sont plus hydrosolubles que liposolubles comme les polyphénols.

❖ La vitamine C

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes O_2^- , du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , des radicaux hydroxyles HO^\bullet et de l'oxygène singlet O_2^\bullet , Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, le produit formé étant le radical ascorbyle. La vitamine C est présente dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes [12,13].

❖ La vitamine E

C'est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement et la diminution de l'athérosclérose. Des études cliniques ont prouvé que les patients d'Alzheimer obtiennent des avantages remarquables au traitement par la vitamine E. On trouve la vitamine E dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes [13,14].

❖ Les oligo-éléments

Les oligo-éléments interviennent comme co-facteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi les oligo-éléments, le zinc, le sélénium et le manganèse ont une action définie.

❖ Le sélénium

Le sélénium est connu pour ses propriétés antioxydantes. Il entre dans la constitution de la glutathion peroxydase. Cette enzyme sélénio-dépendante participe au recyclage du glutathion et réduit la peroxydation lipidique en catalysant la réduction des peroxydes dont le peroxyde d'hydrogène. D'autres rôles sont attribués à cette enzyme : elle interviendrait dans la transduction des signaux cellulaires, la régulation de l'expression de gènes (par son action au niveau des facteurs de transcription), l'induction de Bêta carotène et jouerait donc un rôle clé lors du cycle cellulaire [15].

Le sélénium neutralise les métaux toxiques comme le plomb, mercure et aurait aussi une action préventive sur certains cancers [13,14].

❖ Le manganèse

Le manganèse appartient au suproxyde dismutase mitochondriale. Cette enzyme fait partie du système de défense antioxydant endogène de l'organisme. Elle permet la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

❖ Les Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des constituants membranaires des chloroplastes et forment un groupe de pigments liposolubles. Ils réagissent avec l'oxygène singlet, les radicaux peroxydes et alkyles en capturant les radicaux libres. Ils sont présents dans les légumes, fruits et le lait (exemples : α -carotène, β -carotène, lycopène etc.) impliqués dans la prévention du cancer des poumons et de la prostate (Fig.09) [16].

❖ Composés phénoliques

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Ce sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés anti-oxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxyde et péroxyl. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés de chélation (Fig.09) [13].

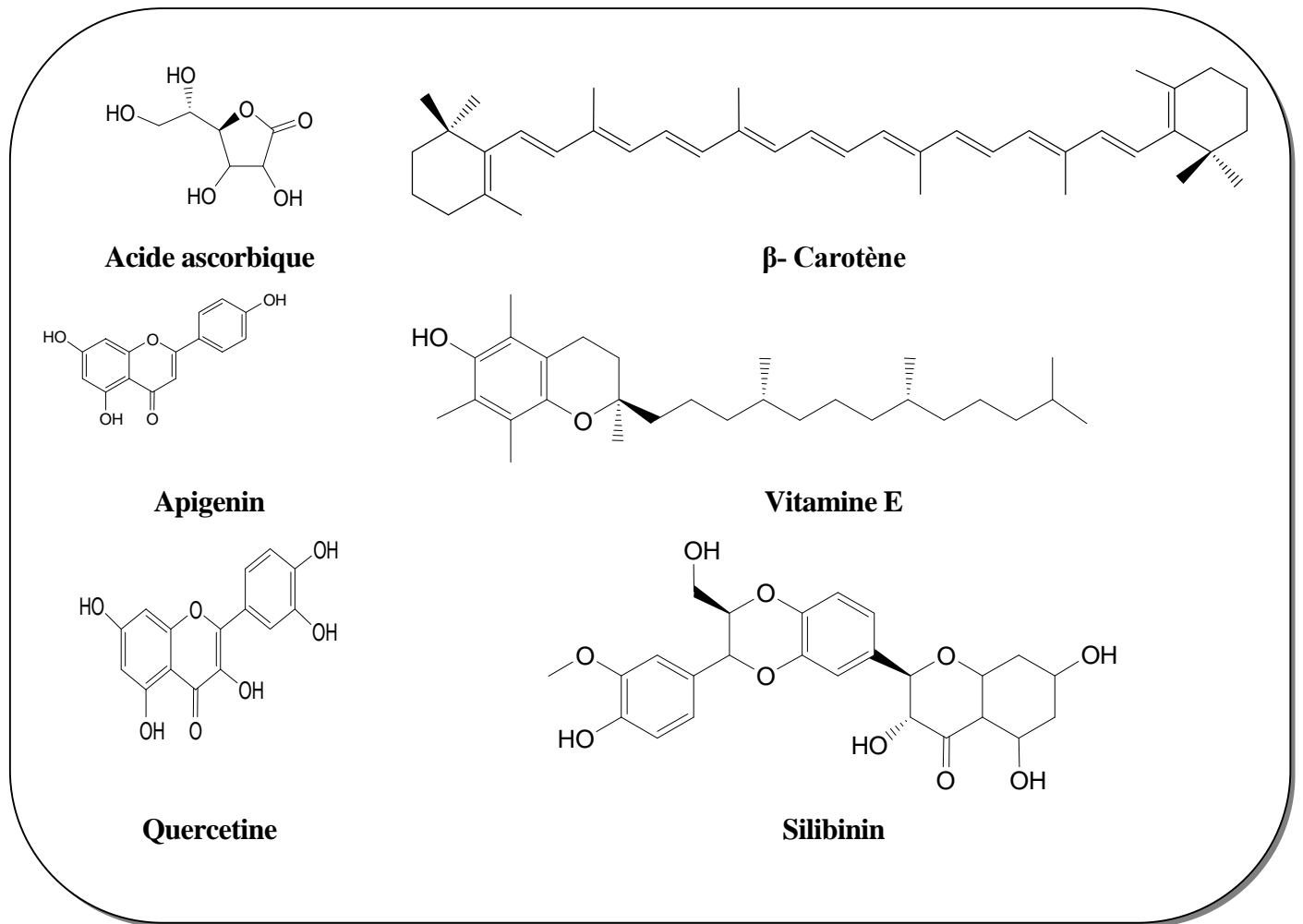


Fig.09 : Structures chimiques des antioxydants naturels.

II.2.4 Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la capacité antioxydante, la majorité de ces méthodes sont basées sur la mesure de la consommation de radicaux libres préalablement formés comme les peroxydes ROO^\bullet . Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature parmi lesquelles nous citons :

II.2.4.1 Test de réduction du radical stable, le DPPH $^\bullet$

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α, α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques, il a plusieurs formes cristallines qui diffèrent par la symétrie du réseau et le point de fusion. La poudre commerciale est un mélange de phases qui fond à 130° . [17]. Le DPPH possède un électron non apparent sur un atome du pont d'azote (**Fig.10**).

Le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant des groupes SH, NH- et OH- [18]. Il s'effectue à température ambiante.

Le corps à doser est ajouté à une solution de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) qui est un radical stable et violet. 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 (ROH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine jaune (DPPH-H) et au radical (A•), selon la réaction suivante : $DPPH^{\bullet} + ROH \rightarrow DPPH-H + RO^{\bullet}$ (Fig.09) [18,19]

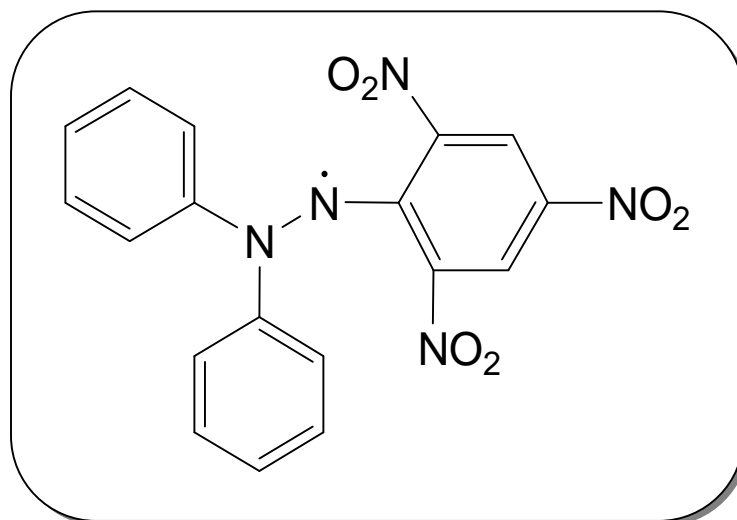


Fig.10 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhényl-1-Picryl-Hydrazyl).

Pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante par DPPH, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction [20,21].

✚ Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage, où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t :

$$[\% = ((Abs\ contrôle - abs) / abs\ contrôle) \times 100\%]$$

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C) [20].

L'indice relative montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixe, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs [20]. Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la

concentration effective CE_{50} (ou l'inverse $1/CE_{50}$) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH[•] dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydant d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE_{50} est petite. L'indice CE_{50} montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH[•] avec 50% (exprimée en mol Antioxydant/mol DPPH[•] ou mg Antioxydant/g DPPH[•]), mais ne prennent pas en considération l'influence de la concentration sur le temps de la réaction [20].

✚ Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, dans la deuxième approche des paramètres cinétiques sont introduits, tels que le temps TEC_{50} nécessaire pour atteindre l'équilibre à CE_{50} , la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique [22-23]. L'estimation de TCE_{50} permet d'introduire la classification suivante : $TCE_{50} < 5$ min (réaction rapide), 5, 30 min (réaction intermédiaire) et $TCE_{50} > 30$ min (réaction lente) [17,20]. L'indice de l'efficacité anti-radicalaire EAR [$EAR = 1/(CE_{50} \cdot TCE_{50})$] relie la concentration du DPPH[•] et le temps TEC_{50} dans l'essai avec la concentration effective CE_{50} de l'échantillon, et résulte dans un paramètre constant pour chaque solution ou extrait.

II.2.4.2 Test FRAP (Ferric reducing ability power)

Le test de FRAP est un exemple pour mesurer la capacité antioxydante, elle est basée sur le transfert d'un électron. Cette technique a été développée par Benzie et son collègue Strain pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin [24]. Cette technique consiste à réduire le complexe ferrique de 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu à $PH=3.6$.

Le problème de cette méthode, elle ne donne pas des résultats avec les antioxydants qui portent les groupes SH (les thiols) [25-27].

II.3 Activité antimicrobienne

II.3.1 Introduction

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes, bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus [28,29]. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave [30].

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes au niveau économique. Aux Etats Unis seuls, ces pertes sont d'environ 20 billions de dollars par an. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique [31].

II.3.2 La diversité du monde microbien

II.3.2.1 Les bactéries

Les **bactéries (Bacteria)**, sont des organismes vivants unicellulaires et procaryotes présents dans tous les milieux.

La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique. Les bactéries les plus grosses mesurent plus de 2 μm et, jusqu'au début du XXI^e siècle, les spécialistes considéraient que les plus petites mesuraient 0,2 μm , mais il existe des « ultramicrobactéries », y compris en eau douce [32].

Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées.

Pour distinguer entre les bactéries au microscope optique, une méthode importante et largement utilisée en bactériologie, c'est "la coloration de Gram". Elle consiste à traiter des bactéries fixées à la chaleur, par un colorant basique (violet de gentiane) puis une solution iodo-iodurée (mordançage), toutes les cellules se colorent en violet. Soumises ensuite à l'action de l'alcool éthylique elles se répartissent en : cellules qui conservent la coloration violette dites à **gram positif** et qui sont décolorées, appelées à **gram négatif**. Pour mieux distinguer ces deux catégories, le frottis bactérien est finalement traité par de la fuchsine basique, les bactéries à gram négatif sont roses et celles à gram positif restent violettes [33].

Après leur réaction avec les différents colorants utilisés par cette méthode, les bactéries se divisent en deux groupes majeurs : bactéries à gram positif (colorées en violet), bactéries à gram négatif (colorées en rose). Cette distinction de réponse à la coloration de gram est due à la différence qui existe dans la composition des parois bactériennes, celles des bactéries à gram négatif laissent passer la solution alcoolique, tandis que celles des bactéries à gram positif représentent une véritable barrière que la solution alcoolique ne peut franchir (**Fig.11, 12**) [33,34].

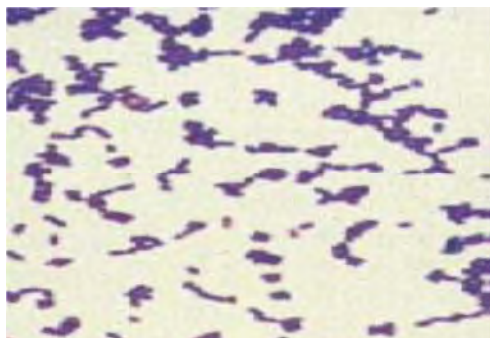


Fig. 11 : Gram positif.



Fig. 12 : Gram négatif.

Bactéries à gram négatif

❖ *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, l'*Escherichia coli*, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux. La presque totalité des souches d' *Escherichia coli* ne sont pas pathogènes puisque cette bactérie est un hôte normal de l'intestin des mammifères [35]. L'*Escherichia coli* est le seul qui soit sans équivoque toujours d'origine fécale et, à ce titre, il est de plus en plus considéré comme l'organisme indicateur spécifique d'une pollution fécale.

❖ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu, est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram-négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés) [33].

❖ *Salmonella typhimurium*

Les salmonelles (*Salmonella*) forment un genre de protéobactéries appartenant à l'ordre des entérobactéries. Elles mesurent 0,7 à 1,5 µm de diamètre, pour 2 à 5 µm de longueur avec un flagelle. Elles provoquent des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la toxi-infection alimentaire [33].

❖ *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii est une bactérie à Gram-négatif du genre *Acinetobacter*.

Il s'agit d'un germe d'infection opportuniste chez l'Homme, particulièrement chez les personnes immunodéprimées et que l'on trouve aussi comme agent de maladies nosocomiales où sa transmission est manu portée. Il a aussi été isolé du sol et de l'eau dans l'environnement.

La bactérie n'est pas toujours responsable d'infections et peut simplement être présente sur la peau ou les muqueuses des patients. Chez les patients fragilisés, elle est à l'origine d'infections variées parfois sévères (infections pulmonaires, septicémies, infections de plaies ou de brûlures...). La létalité des infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* varie entre 17 et 46 % pour les septicémies et peut atteindre 70 % pour les pneumopathies. En France en 2001, *Acinetobacter baumannii* représentait 1,2 % des micro-organismes isolés d'infections nosocomiales. En service de réanimation, on l'isolait dans 5 % des infections pulmonaires [36].

Une souche d'*Acinetobacter baumannii* responsable d'une épidémie de 12 patients a été identifiée pour la première fois à l'Hôpital de Valenciennes en 2003.

❖ *Klebsiella pneumoniae*

Le genre *Klebsiella* (klebsielles), de la famille des entérobactéries, comporte cinq espèces (contre) dont l'espèce-type est *Klebsiella pneumoniae* qui est la plus fréquente. La *Klebsiella* est une espèce de bactérie dont la plus connue est la *Klebsiella pneumoniae*. La *Klebsiella* est naturellement présente au niveau de certains organes comme le tube digestif ou les poumons, mais son action est bien contrôlée par l'organisme, d'où l'absence d'infection. A la faveur d'un organisme immunodéprimé c'est-à-dire dont les défenses immunitaires sont diminuées ou d'un autre événement intercurrent, cette bactérie peut devenir « agressive » et être responsable d'angines, d'infections pulmonaires, parfois d'infections urinaires ou d'infections plus généralisées [37].

❖ *Enterobacter cloacae* [38]

Enterobacter est un genre de bactérie appartenant à la classe des Gamma proteobacteria et à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'un bacille à coloration de Gram négatif, chimio-hétérotrophe. L'habitat est l'intestin de l'Homme et des animaux, *Enterobacter* est aussi trouvé

dans les selles, les eaux d'égouts, le sol, les produits laitiers. Certaines souches du genre *Enterobacter* peuvent être responsables d'infections nosocomiales.

- *Enterobacter aerogenes* est une bactérie commensale du tube digestif. Elle peut être responsable d'infections urinaires et d'infections nosocomiales. Il existe des problèmes de polyrésistance aux antibiotiques.
- *Enterobacter cloacae* commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux, pouvant être rencontré dans le sol et les eaux d'égouts. Certaines souches peuvent être responsables d'infections nosocomiales.
- *Enterobacter sakazakii* est une cause rare mais connue de septicémie néonatale et d'une forme de méningite à évolution grave, provoquant une mortalité de 10 à 80 %. Plusieurs infections ont été mises en rapport avec la consommation d'aliments pour nourrissons, et a fait l'objet d'un avis de l'AFSCA en 2004.

❖ *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis est une bactérie de type bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries et au genre *Proteus*. Elle est commensale du tube digestif des animaux et peut être responsable d'infections essentiellement urinaires et cutanées. Cette bactérie est habituellement sensible aux antibiotiques actifs sur les entérobactéries, à l'exception de la colistine et des cyclines [37].

Bactéries à gram positifs

❖ *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de NaCl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs.

Le staphylococcus est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et catalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom [32].

❖ *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis est une bactérie commensale à Gram positif, habitant dans le tube digestif des humains et d'autres mammifères.

Comme d'autres espèces du genre *Enterococcus*, *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'homme et le singe, particulièrement dans un environnement hospitalier : le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité¹ et au risque nosocomial. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin [38].

❖ *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie à Gram-positif, du genre *Listeria*, division des Firmicutes, qui doit son nom à Joseph Lister.

C'est la seule espèce du genre *Listeria* pathogène pour l'homme ; il s'agit d'un bacille de petite taille, non sporulé, aéro-anaérobie facultatif, ubiquitaire (sol, végétaux, eau), possédant une catalase et mobile à 20 °C. Selon certaines études, 1 à 10 % des humains seraient porteurs sains de *L. monocytogenes* dans leur intestin [39,40].

❖ *Bacillus cereus*

Les souches de *Bacillus cereus* sont constituées de bacilles Gram positif de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes [41,42]. *B. cereus* est anaérobie facultatif, mobile et capable de former des endospores, et ses colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre [43]. Une croissance est observée à des températures se situant entre 10-20 °C et 35-45 °C, la température optimale étant d'environ 37 °C [41,42]. Le bacille peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches [42,44].

II.3.2.2 Les champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes pluricellulaires ou unicellulaires. Le terme champignon est devenu ambigu car il désigne un taxon obsolète. Ce terme englobe à la fois les *Fungi* (ou *Mycota*), les *Oomycota*, les *Chytridiomycota* et les *Mycetozoa*. Leurs cellules, pourvues d'une paroi chitineuse ou cellulosique, sont immobiles et se nourrissent par l'absorption des molécules organiques directement dans le milieu. La cellule ou les cellules sont dépourvues de chlorophylles et/ou de plastides car ces organismes sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone. Leur appareil végétatif est un thalle : ce sont donc des thallophytes.

- *Candida albicans* est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. C'est un organisme vivant à l'état naturel dans les muqueuses de l'être humain. On le retrouve chez 80 % de la population, et il n'entraîne habituellement aucune maladie ou symptôme en particulier.

II.4 Des propriétés antimicrobiennes importantes des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est connue de façon empirique depuis l'Antiquité. Elle est à mettre en relation avec sa composition chimique, et les possibles effets synergétiques. Les huiles essentielles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production du pseudo-mycélium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures. Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols : thymol, carvacrol et eugénol. Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation. Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent [45].

II.5 Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

II.5.1 Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque) [46]

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai.

Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne chevauchent

pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose (**Fig.13**).

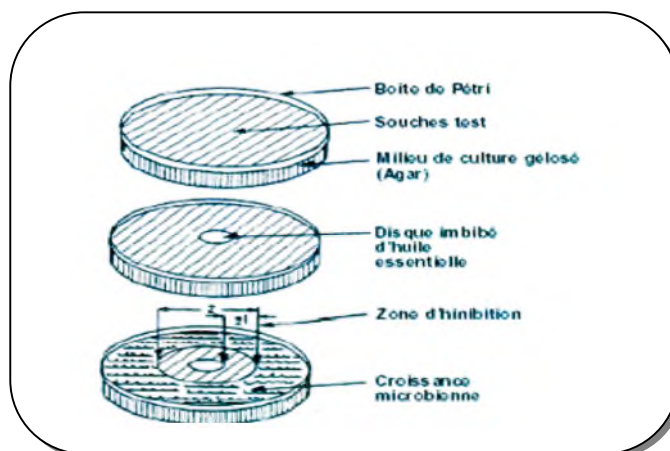


Fig. 13 : Méthode de la diffusion en disque.

II.5.2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution)

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/ml ou mg/L). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate. Concernant les huiles essentielles, les techniques de détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI sont décrites par plusieurs études [47, 48].

II.5.2.1 La dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution). L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses.

II.5.2.2 La dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

II.5.2.3 Méthode bio autographique

La méthode bio autographique consiste en l'isolement des constituants actifs à travers une cible après dilution rapide. Les chromatogrammes sont recouverts d'un milieu de culture incorporé de microorganismes. Après une incubation pendant 24 heures à 37 °C, un révélateur approprié permet d'observer l'activité [47].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Reynal B.**, Multon J.L, Additif et auxiliaire de fabrication dans les industries agroalimentaire, Ed. Tec & Dec, **2009**, p.119, **ISBN**: 978-2-7430-1071-3.
- [2] **Blot W.**, Li JY, Taylor P., Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease – specific mortality in the general population. *The Journal of the National Cancer Institute*, **1993**, 85: 1483-1491.
- [3] **Guinebert E.**, Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*, **2005**, p. 554-558.
- [4] **Georgetti S.R.**, Evaluation of the Antioxidant Activity of Different Flavonoids by the Chimiluminescence Method. *AAPS. Journal of Pharmaceutical Science*, **2003**, 5(2) : 5.
- [5] **Favier A.**, Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *L'actualité Chimique*, **2003**, p.108, 115.
- [6] **Atawodi S.E.**, Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, **2005**, 4(2) : 128, 133.
- [7] **Diallo A.**, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtacées), Thèse de Doctorat en Pharmacie université de Bamako, **2005**, p.11, 13.
- [8] **Barus C.**, Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques, Thèse de Doctorat université de Toulouse, **2008**, p.8
- [9] **Lévy-Dutel L.**, Scotto E., Les saveurs du bien être : Vivre heureux et centenaire, Ed. Eyrolles, **2011**, p. 31, **ISBN** : 97B-2-212-54681-1.
- [10] **Rolland Y.**, Antioxydants naturels végétaux, *Oléagineux. Corps Gras Lipides (CPL)*, **2004**, 11 (6) : 419-24.
- [11] **Dacosta Y.**, Les phytonutriments bioactifs : 669 réféérences bibliographiques, Ed. Yves Dacosta, Paris, **2003**, p. 317.
- [12] **Colette E.**, Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite, Thèse Doctorat Pharmacie université de Bamako, **2003**, p.147.

- [13] **Jain P.**, Pareek A., Ratan Y., Sharma S., Paliwal S., Free Radicals and Dietary Antioxidants: A Potential Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **2013**, 18 (1), ISSN 0976 – 044X.
- [14] **Ahamet S.**, Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (*Balanitacées*), Thèse Doctorat Pharmacie université de Bamako, **2003**, p.117.
- [15] **Pastre J.O. C.**, Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques, Thèse Doctorat université de Toulouse, 2005, **p.28-30**.
- [16] **Hale A.L.**, Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis, Office of Graduate Studies of Texas A & M University Genetics, **2003**, p.260.
- [17] **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.
- [18] **Sanchez-Moreno C.**, Larrauri Jose A., Saura-Calixto F., A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, 76(2): 270-276.
- [19] **Scherer R.**, Godoy H. T., Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, **2009**, 112: 654-658
- [20] **Villano D.**, Fernandez-Pachon M.S., Moy M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* **2007**, 71: 230-235.
- [21] **Nenadis N.**, Tsimido M. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **2002**, 79(12) : 1191-1195
- [22] **Popovici C.**, Saykova I., Tylkowski B., Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. **2009**, 4 : 25-39
- [23] **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): 121-137.

- [24] **Benzie** I.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.
- [25] **Pinchuk** I., Shoval H., Dotan Y., Lichtenberg D., Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, **2012**, 165: 638– 647.
- [26] **Alam** M. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **2013**, 21:143–152.
- [27] **Badarinath** A.V., K. Mallikarjuna R.A., Madhu Sudhana Chetty C., Ramkanth S., Rajan T.V.S, Gnanaprakash K., A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of Pharmaceutical Technology*, 2(2): 1276-1285.
- [28] **Hill** R.B.J., Rowlands D.J.& Rifkind D., Infectious pulmonary disease inpatient receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. *The New England Journal of Medicine*, **1964**, 271: 1021-1028.
- [29] **Hart** P.E, Russel E.Jr & Remington J.S., The compromised host and infection II, Deep fungal infection. *The Journal of Infectious Disease*, **1969**, 120: 169-176.
- [30] **Persidis** A., Antibacterial and antifungal drug discovery. *Nature Biotechnology*, **1999**, 17:1141-1142.
- [31] **Rhayour** K., Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de Doctorat de Biologie Cellulaire université de Fès, **2002**, p.2.
- [32] **Hahn** M. W., Lunsdorf H., Schauer M., Hofle M. G., Boenigk J., and Stadtler P., Isolation of novel ultra-micro-bacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied Environmental of Microbiology*, **2003**, 69:1442-1451.
- [33] **Leclerc** H., Gaillard J-L, Simonet M., Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien, Doin Editeur, Paris, **1995**, p.506.
- [34] **Madigan** M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall International Ed., **1997**.
- [35] **Edberg** S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J., *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, **2000**, 88: 106S-116S.

- [36] **Poirel L.**, Menuteau O., Agoli N., Cattoen C., Nordmann P., Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**, 41(8) : 3542-3547.
- [37] **Berche P.**, Gaillard J-L and Simon M. Bactériologie bactéries des infections humaines, Médecine-Sciences Flammarion, **1989**, p109.
- [38] **Ruiz-Garbajosa P.**, Canton R., Pintado V., Coque TM., Willems R., Baquero F., Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. *Clinical Microbiology and Infection*, **2006**, 12: 1193-1198.
- [39] **Low J.C.**, Donachie W., *A review of Listeria monocytogenes and listeriosis*. *Veterinary Journal*, **1997**, 153: 9-29.
- [40] **Donnelly C.W.**, *Listeria monocytogenes: A continuing challenge*. *Nutrition Reviews*, **2001**, 59: 183-194.
- [41] **Murray P.R.**, Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry ML., Pfaller M.A., *Manual of Clinical Microbiology*, 9.Ed. American Society of Microbiology Press, **2007**.
- [42] **Logan N.A.**, Rodrigez-Diaz M., *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, Ed. Hawkey, **2006**, p.139-158.
- [43] **Ray C. G.**, *Enteric Infections and Food Poisoning*, Sherris Medical Microbiology, 4 Ed. Mcgraw Hill, USA, **2004**, p. 857-865.
- [44] **From C.**, Pukall R., Schumann P., Hormazabal V., Granum P. E., Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, 71(3): 1178-1183.
- [45] **Zambonelli A.**, D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A., Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymusvulgaris*. *Journal of Essential Oil Reserch*, **2004**, 16: 69-74.
- [46] **Alawa C.B.I.**, Adamu A.M., Gefu J.O., Ajanusi O.J., Abdu P.A., Chiezey N.P., Alawa J.N., Bawman D.D., In vitro screening of two Nigerian medicinal plants, *Vernonia amygdalina* and *Annonasenegalensis*, for anthelmintic activity. *Elsevier Science*, **2003**, 73- 81.
- [47] **Chaker E.K.**, Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, Thèse de Doctora université de Toulouse, **2010**, p.70-71.

[48] **Bendahou** M., Muselli A., Grignon- Dubois M., Benyoucef M., Desjobert JM., Bernardini AF., Costa J., Antimicrobial activity and Chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential Oil and Extract Obtained by Microwave extraction: Comparison with Hydrodistillation. *Food chemistry*, **2008**, 106: 132-139.

Chapitre III

CHAPITRE III : Synthèse bibliographique sur les espèces retenues

III.1 Présentation de la famille des pinacées

La famille des Pinacées (*Pinaceae*), ou Abiétacées, est une famille des plantes gymnospermes qui compte 220-250 espèces réparties en 11 genres. Elles sont originaires et peuplent abondamment les régions tempérées du globe terrestre [1]. Les Pinacées sont des arbres (2 - à 100 m de haut), leurs feuilles sont des aiguilles vertes, piquantes ou non, plus ou moins longues, attachées seules aux rameaux, ou réunies par 2 ou en rosettes. Les Pinacées sont des "conifères", c'est-à-dire des plantes portant des cônes, organes de reproduction qui ne sont ni des inflorescences ni des infrutescences. Ce sont des plantes monoïques :

- les cônes mâles, ressemblant à des chatons dressés, bien que petits, produisent une grande quantité de pollen jaune à jaune orangé dispersé par le vent,

- les cônes femelles, plus gros, dressés sur les rameaux ou pendants au-dessous, contiennent les ovules nus (non enfermés dans un ovaire), qui, après fécondation, deviennent des graines ailées [1-3].

Cette famille est représentée en Algérie par trois genres :

- Genre *Abies* (le sapin),
- Genre *Cedrus* (le cèdre),
- Genre *Pinus* (les pins).

Le genre *Pinus* comprend plus de 120 d'espèces dans le monde, ce genre s'est différencié en 2 sous-genres correspondant aux *Strobus* et aux *Pinus*. La plupart de ces espèces, dont les racines, associées à des champignons mycorhiziens fixent l'azote du sol, se contentent de sol pauvre. Les *Pinus* sont des espèces qui se produisent par semis. Ils ont longuement été utilisés dans les reboisements, leur bois convient à la papeterie, la caisserie et éventuellement à la menuiserie [2,4].

III.2 Répartition géographique

Le genre *Pinus* se répartie dans le monde, on le trouve dans des régions assez variées et essentiellement autour des côtes méditerranéennes, et plus particulièrement en Afrique du nord et en Espagne. En Algérie même à cause de la nature du climat et du sol qui s’y prête bien sûr. Ils aiment les zones à climat tempéré-froid de l’hémisphère boréal, 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 (**Fig.14**) [3].



Fig.14 : Aire de répartition naturelle des *Pinus*.

III.3 Description botanique des plantes étudiées

III.3.1 *Pinus halepensis*

C’est l’arbre le plus répandu en Algérie, avec une surface qui avoisine 900 000 hectares. La hauteur du pin d’Alep est très variable, de 6 à 20 mètres dans les conditions de milieux les plus diversifiées. L’écorce des jeunes sujets est lisse, de couleur gris argenté ; celle des arbres adultes est épaisse, profondément crevassée, de couleur noirâtre à rougeâtre.

Les feuilles sont fines, longues de 5 à 10 cm, réunies par deux dans une même gaine, larges au plus de 1 mm, d’un vert clair.

Les cônes persistent indéfiniment sur l'arbre après avoir perdu leurs graines. Le cône est long de 8 à 12 cm, large de 3,5 à 4,5 cm, d'abord vert, puis devient rouge violacé, finalement arrivé à maturité brun rougeâtre à jaunâtre (**Fig. 15, 16**).

Le Pin d'Alep s'étend dans toute la région méditerranéenne. En Algérie, on le trouve depuis le littoral jusqu'à 2000 mètres d'altitude, dans l'Atlas Saharien.



Fig.15 : Arbre de *Pinus halepensis*.



Fig.16 : Aiguilles et cônes de *Pinus halepensis*.

III.3.2 *Pinus pinaster*

C'est un arbre de grande importance en Algérie, se rencontre sur le littoral du tell oriental, avec des hauteurs moyennes de 15 mètres (**Fig. 17- 19**).

- ✓ Les feuilles sont plus longues (20 cm) et plus larges que celles du *Pinus halepensis*, groupées par deux.
- ✓ L'écorce est aussi plus épaisse et plus foncée.
- ✓ Les cônes sont longs de 10 à 20 cm, larges de 5 à 7 cm, mûrissent à la fin de la deuxième année et à l'inverse du *Pinus halepensis*, laissent échapper leurs graines de suite.
- ✓ Les graines sont longues de 8 à 10 mm, noires et luisantes sur une face, gris mat sur l'autre.

Le *Pin pinaster* est répandu dans la région méditerranéenne (France, Espagne, Portugal, Tunisie, etc.), en Algérie les plus beaux peuplements se rencontrent à Collo et à Jijel [5].



Fig.17 : Arbre de *Pinus pinaster*



Fig.18 : Cône de *Pinus pinaster*



Fig.19 : Aiguilles de *Pinus pinaster*

III.3.3 *Pinus pinea* (pin parasol)

Comme l'indique son nom, ce Pin a un port se terminant par une cime en parasol (**Fig. 20- 22**).

- ✓ Les feuilles sont assez longues, de 8 à 20 cm, réunies par deux et quelques fois par trois.
- ✓ Les cônes sont aussi très caractéristiques de ce Pin, presque globuleux, long de 8 à 15 cm, large de 7 à 10 cm, composé d'écaillés à larges écussons.

Les graines sont grosses de 1,5 à 2 cm, longues avec une coque dure. La graine appelée "Zgougou" est comestible, utilisée dans la pâtisserie.

Il a été introduit en Algérie, a donné de bon résultat avec une croissance plus que satisfaisante [5].



Fig.20: Aiguilles de *Pinus pinea*.

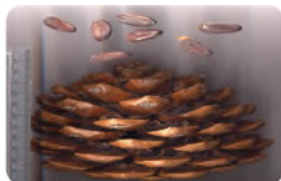


Fig.21: Fruit de *Pinus pinea*.



Fig.22 :Arbre de *Pinus pinea*.

III.4 Taxonomie [6]

La place de *Pinus* dans la taxonomie botanique est la suivante (**Tableau 01**):

Tableau 01 : Positon taxonomique de *Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* et *Pinus pinaster*.

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

III.5 Utilisations traditionnelles [7]

Le genre *Pinus* est très connu pour ses propriétés en médecine traditionnelle algérienne comme :

- ✓ Antiseptique puissant à action dynamisante ; recommandé dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires, les calculs biliaires.
- ✓ Rubéfiant et balsamique, efficace dans les affections pulmonaires : la grippe, la sinusite, les rhumatismes.
- ✓ Les sirops, les infusions, les tisanes, les jus de *Pinus halepensis* sont connus par leur effet balsamique pour vaincre les affections catarrhales du système respiratoire.
- ✓ On utilise les bourgeons de cette espèce en parfumerie et en savonnerie.

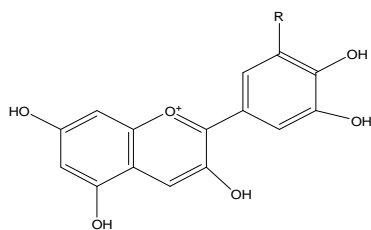
III.6 Travaux antérieurs

Le genre *Pinus* a fait l'objet de beaucoup d'études publiées se rapportant à la chimie et à la pharmacologie de ses extraits bruts ou purifiés.

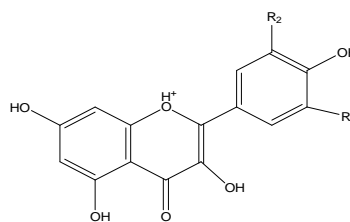
Plusieurs équipes de recherche ont mené des études sur la chimie de *Pinus halepensis* Mill. Permettant ainsi l'isolation d'un grand nombre de métabolites secondaires.

III. 6. 1 Flavonoïdes

Kaundun et Coll. [8] ont isolé les flavonoïdes à partir des aiguilles. Ces derniers ont été analysés par CLHP (Fig.23).



R= H cyanidine
R= OH delphinidine



R₁ = R₂ = H kaempferol
R₁ = OH, R₂ = H quercetine
R₁ = OCH₃, R₂ = H isorhomnetine
R₁ = R₂ = OH myricetine
R₁ = OCH₃, R₂ = OH larycitrine
R₁ = R₂ = OCH₃ syringetine

Fig.23 : Flavonoïdes des aiguilles de *P.halepensis*.

III.6. 2 Composés phénoliques - Acides gras -Terpénoïdes

Les études phytochimiques réalisées sur les racines et les aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.ont permis de mettre en évidence les composés phénoliques (50%), les acides gras (44%), et les terpénoïdes [9].

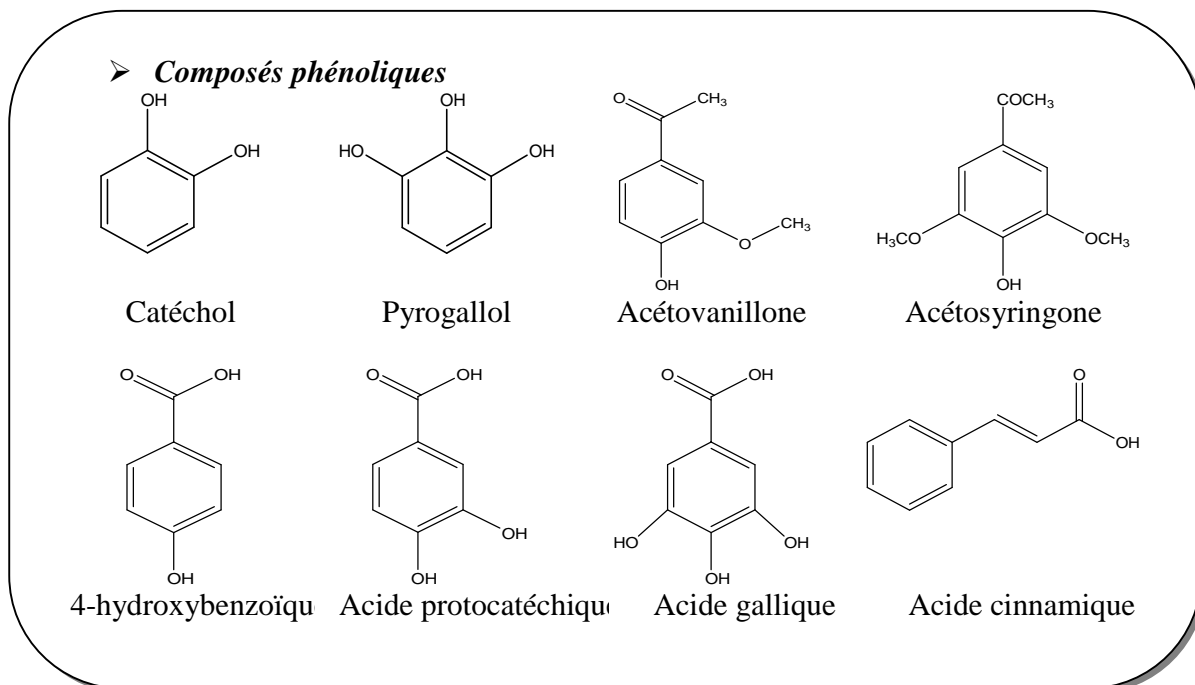


Fig.24 : Composés phénoliques des aiguilles de *P.halepensis*.

III.6. 3 Lipides

L'étude de la fraction lipidique contenue dans les graines de *Pinus halepensis* Mill. montre la composition suivante : 22.7% de protéines, 43.3% d'huile, 8.3% de cendre, 25.7 % de glucides, et une faible quantité (1%) des éléments minéraux (K, Mg, Ca).

L'identification des acides gras de l'huile des graines de *Pinus halepensis* a été réalisée par CPG/SM. Cette dernière a permis de déduire sa richesse en acides insaturés (acide oléique, 27.3% et acide linoléique, 48.8%) et d'autres acides saturés comme l'acide palmitique (8.75%).

Cette composition riche en acide linoléique rend ces huiles plus résistantes à l'oxydation. Ces huiles peuvent être utilisées dans les aliments, les produits pharmaceutiques, cosmétiques et autres industries non alimentaires [10].

III.6. 4 Huiles essentielles

La composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des aiguilles de *Pinus halepensis*, a fait l'objet d'un grand nombre d'études. Dans la suite de cet exposé, nous présenterons une synthèse des études portant sur les huiles essentielles :

Bien que la plupart de ces huiles essentielles soient considérées comme très riches en monoterpènes, plusieurs compositions se distinguent :

- Trans caryophyllène est le composé ultra majoritaire d'un échantillon de Saida (25%) et de Sidi feredj (40.3%) [11,12].
- l' α -Pinène et le Myrcène dominant la composition chimique de plusieurs échantillons, l'un ou l'autre étant le composé majoritaire : Italie : (18.1 et 27.9%) [13], Maroc : (23.3% et 16.3 %) [14] et Tissemsilt : (17.6 % et 8.7%) [15].
- l' α -Pinène et le β - Pinène sont les composés majoritaires de l'huile essentielle provenant de la Turquie [16].
- Quelques huiles essentielles possèdent également des composés oxygénés comme composés majoritaires. Par exemple, Oxide de caryophyllène (48,2%) et Bulnésol (7.6%), qui caractérisent l'huile de *P.halepensis* Ghazaouet (une région d'Algérie) et celle de Grèce respectivement [17,18].

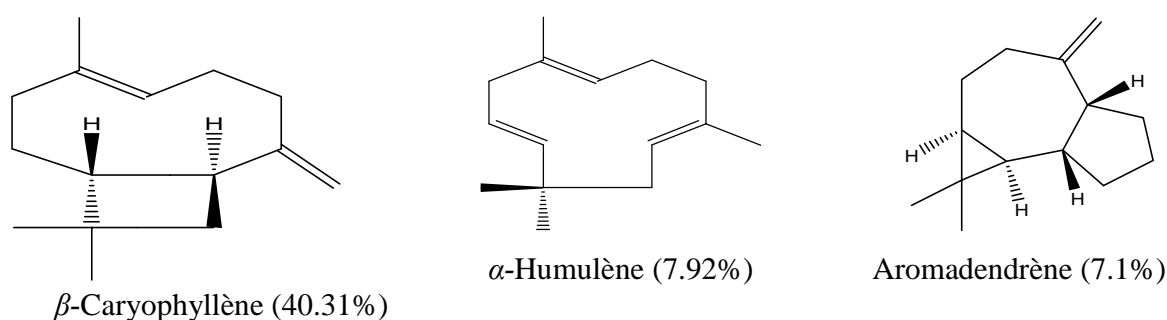


Fig.25 : Quelques composés des huiles essentielles des aiguilles de *P.halepensis*.

L'analyse des huiles essentielles, extraites par hydrodistillation des aiguilles de *Pinus pinea* de Turquie, a été réalisée par CPG-CPG/SM. Soixante-six composés ont été identifiés représentant 98.5% de l'huile totale. Elle est caractérisée par sa richesse en monoterpènes hydrocarbonés (73.1%). Les composés majoritaires sont le Limonène (54.1%), α -Pinène (7.7%) et β -Pinène (3.4%) [19]. En ce qui concerne l'huile essentielle des cônes de Turquie, une publication décrit le limonène comme composé ultra-majoritaire (62.8%) [20], l'huile essentielle des aiguilles de *P.pinea* de la Tunisie possède comme composés majoritaires : Limonène (35.9%), α -Pinène (6.4%) comme composés majoritaires [21].

La composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus pinaster*, extraites par hydrodistillation, a fait l'objet de diverses études. L' α -Pinène est le composé majoritaire des huiles essentielles d'aiguilles de pin maritime de Russie (99,8%) [22], du α -Pinène (28.9%) et β -pinène (21.7%) sont les deux composés majoritaires des huiles essentielles d'aiguilles de *Pinus pinaster* récolté en Italie [13].

La composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus pinaster* récolté en Algérie et Maroc est caractérisée par sa richesse en sesquiterpènes : (*E*)- β -caryophyllène (Algérie : 26.6% et Maroc : 22.2%) [11,14].

Tableau 02 : Principaux composants des huiles essentielles du *P.halepensis*, *P.pinaster* et *P.pinea* des différentes origines signalé précédemment

<i>Pinus</i>	Organes	Origines	Composés majoritaires	Références
<i>Halepensis</i>		Algérie	Oxide de caryophyllène (48,2%), Thumbergol (8,8%) et Oxide de humulène 6.7%	[17]
	Aiguilles		α - Humulène (10.5%), Trans caryophyllène (25%)	[12]
	Aiguilles		Trans caryophyllène (40.3%), α - Humulène (7.9%), Aromadendrène (7.1%)	[11]
	Aiguilles		Myrcène (8.7%), 2-Phényléthyl isovalérate (7.4%)	[15]
	Rameaux		α -Pinène (17.6 %), 2-Phényléthyl isovalérate (8.4%)	[15]
	Aiguilles	Grèce	Bulnésol (7.6%), 3-Carène (6.9%)	[18]
	Aiguilles	Italie	α -Pinène (18.1 %), Sabinène (9.4%), Myrcène (27.9%), α -Terpinolene (9.9%) Myrcène (12.5%), P- Cymène (11.4%)	[13]
	Aiguilles	Maroc	α -Pinène (23.3 %), Myrcène (16.3 %), α -Terpinolène (10.1%) α -Pinène (47.1%), Trans caryophyllène (11.2%)	[14] [20]
	Aiguilles	Turquie	α -Pinène (18.4 %), β -Pinène (46.8%), Germacrène D (8.8%), Trans caryophyllène (9.2%)	[16]
	Aiguilles		α -Pinène (16.4 %), β -Pinène (18.7%), 3-Carène (16.3%), Limonène (18.7%), Trans caryophyllène (9.5%)	[16]
<i>Pinaster</i>	Aiguilles	Algérie	(E)- β -Caryophyllène (26,6%) et de l'allo-Aromadendrène (12,5%)	[11]
	Aiguilles	Maroc	β -Caryophyllène (22.2%) et α -Pinène (21,4%)	[14]
	Aiguilles	Russie	α -Pinène (99,8%)	[23]
	Aiguilles	Italie	α -Pinène (28.9%) et β -Pinène (21.7%)	[13]
	Cônes	Italie	α -Pinène (24,7%), β -Pinène (29,2%) et Longifolène (20,8%)	[13]
<i>Pinea</i>	Aiguilles	Maroc	α -Pinène (37.0%),	[14]
	Aiguilles	Tunisie	Limonène (35.9%), α -Pinène (6.4%).	[21]
	Aiguilles	Grèce	Limonène (39.1%), β -Phellandrène (13.8%)	[18]

Chapitre III : Synthèse bibliographique sur les espèces retenues

Cônes	Turquie	Limonène (62.8%)	[20]
Aiguilles	Turquie	α -Pinène (15.1 %), β -Pinène (42.4%), Germacrène D (10.2%)	
Rameau	Turquie	α -Pinène (14 %), β -Pinène (29.9%)	
Aiguilles	Turquie	Limonène (54.1%), α -Pinène (7.7%), and β -pinène (3.4%).	[19]

REFERENCES

- [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**, 2: 504–517.
- [2] **Farjon** A., Pinaceae. Königstein (Germany): Koeltz Scientific Book, **1990**.
- [3] **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.
- [4] **Mathilde** M., Larousse Agricole le monde agricole au XXI^e siècle), Ed. **2002**, p.480-481.
- [5] **Quezel** 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.
- [6] **Smaïhi** A., Influence du type de pineraies (pineraie, pineraie chenaie) sur la mobilisation et le comportement de plantules de pin d'Alep dans des sols forestiers de la région de Batna, Thèse de Magistère université de Batna, **2009**, p.2.
- [7] **Lucienne** A., Les plantes médicinales d'Algérie, Ed. BERTI Alger, **2010**, p.200-201.
- [8] **Kaudum** S., Lebreton P., Fady B., Geographical variability of *Pinus halepensis* Mill. as revealed by foliar flavonoids. *Biochemical Systematic and Ecological*, **1998**, p.162-163.
- [9] **Catherine** F., Variations in Allelochemical Composition of Leachates of Different Organs and Maturity Stages of *Pinus halepensis*. *Journal of Chemical Ecology*, **2009**, 35:970–979.
- [10] **Cheikh** S., Hentati B., Besbes S., Blecker C., Deroanne C., Attia H. Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food Sciences and Technology International*, **2006**, 12(5): 407-415.
- [11] **Dob** T., Berramdane T., Chelghoum C., Analysis of essential oil from the needles of *Pinus pinaster* growing in Algeria. *Comptes Rendue*, **2005**, 41: (5) 545-548.
- [12] **Dob** T., Berramdane T., Chelghoum C., Essential oil composition of *Pinus halepensis* Mill. from three different regions of Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **2007**, 19: 40-43.
- [13] **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.

- [14] **Hmamouchi** M., Hamamouchi J., Zouhdi M., Bessiere J. M., Chemical and Antimicrobial Properties of Essential Oils of Five Moroccan Pinaceae. *Journal of Essential Oil Research*, **2001**, 13 (4): 298-302.
- [15] **Tazerouti** F., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y., Meklati B.Y., Favre- Bonvin J., Bobenrieth M.J., Analysis of essential oils from needles of *Pinus halepensis* Mill. by gas chromatography and mass spectrometry. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, **1993**, 26(3): 161-176.
- [16] **Ustun** O., Sezer Senol F., Kurkcuoglu M., Erdogan Orhan I., Kartal M., Baser H.C.K., Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Corps and product*, **2012**, 38: 115-123.
- [17] **Abi-Ayad** M., Abi-Ayad FZ., Lazzouni HA., Rebiahi S.A., Ziani-Cherif C., Bessiere JM., Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2011**, 5(22): 5433-5436.
- [18] **Roussis** V., Petrakis P.V., Ortiz A., Mazomenos E.B., Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*. **1995**, 39(2): 357-361.
- [19] **Amri** I., Hamrouni L., Fezzani M.T., Jamoussi B., Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, **2012**, 85(2):199-207.
- [20] **Tumen** I., Hafizoglu H., Kilic A., Dönmez IE., Sivrikaya H., Reunanen M., Yields and Constituents of Essential Oil from Cones of *Pinaceae* Grown in Turkey. *Molecules*, **2010**, 15: 5797-5806.
- [21] **Nasri** N. , Tlili N. , Triki S. , Elfalleh W. , Chéraïf I. & Khaldi A., Volatile Constituents of *Pinus pinea* L. Needles. *Journal of Essential Oil Research*, **2011**, 23(2): 15-19.
- [22] **Kolesnikova** R.D., Verissimo N., Ulyanova I. *Rastit. Resur*, **1983**, 19: 364-366.

Chapitre IV

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

IV.1 Introduction

Dans notre travail de thèse nous nous sommes intéressés à l'étude chimique de trois pinacées (*Pinus halepensis*, *Pinus pinea* et *Pinus pinaster*). Cet intérêt est motivé par ses vertus thérapeutiques connus chez les herboristes, les tradipraticiens et les personnes âgées. En effet, les enquêtes ethnopharmacologiques révèlent son emploi dans la thérapeutique traditionnelle, seul ou mélangé à d'autres plantes, pour soigner la bronchite et la tuberculose.

IV.2 Echantillonnage et période de récolte

➤ *Pinus halepensis*

L'espèce *Pinus halepensis*, a été récoltée de différentes régions dans la Wilaya de Tlemcen (**Tableau 03**). La matière végétale (aiguilles, cônes et tiges) est ensuite, déposée dans un endroit sombre, sec et aéré afin de la sécher. Ensuite elle est conservée dans des flacons jusqu'à son utilisation.

Tableau 03: Etude bioclimatique des stations étudiées pour *Pinus halepensis*

Régions	Latitude (N)	Longitude (O)	Altitude (m)
Bab el Assa	34°58'08.36''	2°01'40.85''	537
Sidi youchae	35°06'54.21''	1°46'29.77''	296
Mehrez	35°00'34.52''	1°37'01.96''	687
Nedroma	35°00'42.52''	1°44'33.21''	465
Ghazaouet	35°06'11.31''	1°51'04.62''	458
Hwanet	34°58'23.97''	1°48'10.26''	660
Bab Taza	34°58'13.09''	1°45'16.48''	662
Oued Tleta	35°03'51.11''	1°44'59.57''	197
Agadir	34°53'21.30''	1°18'06.60''	914
Mansourah	34°52'27.28''	1°19'11.15''	983
Amieur	35°01'59.44''	1°15'20.16''	706

➤ *Pinus pinea* et *Pinus pinaster*

Les deux espèces (*Pinus pinea* et *Pinaster*) sont cueillies de différentes stations dans la Wilaya de Tlemcen, durant le mois d'Avril 2012.

Tableau 04 : Etude bioclimatique des stations étudiées pour *Pinus pinaster* et *pinia*

Samples Regions	Latitudes (N)	Longitudes (O)	Altitudes (m)
Yaghomracen	34°56'11.16''	1°17'40,15''	814m
Ain defla	34°53'13.43''	1°18'34.86''	771m
Chatouane	34°53'15.27''	1°18'48.06''	784m
Bouhannak	35°52'55.8''	1°22'05.31''	766m
Djebala	34°55'59.32''	1°49'35.40''	777m
Zenata	35°02'19.21''	1°27'32.62''	280m
Oueled Hasna	35°03'01.79''	1°18'37.93''	241m
bedar	35°55'14''.00''	1°17'29''.00''	131m
Behira	35°03'36.78''	1°58'11.07''	198m

IV.3 Identification botanique

L'identification botanique des trois espèces a été faite par le Professeur N. BENABADJI du Département de Biologie, Université Abou BekrBelkaïd –Tlemcen.

IV.4 Le stockage des plantes

Avant le stockage des plantes, nous devons bien vérifier qu'elles sont parfaitement séchées car la moindre trace d'humidité déclencherait des moisissures qui rendraient la drogue inutilisable. Les plantes sont suffisamment sèches lorsqu'elles se brisent ou se cassent avec un bruit. Les drogues sèches doivent être placées dans des récipients bien secs, ou dans des sacs en papier.

Elles ne doivent pas être conservées dans des boîtes ou des sacs en plastiques ordinaires, comme le polyéthylène. Des expériences ont démontré qu'ils entraînaient des modifications et que les végétaux qui y avaient séjourné n'avaient plus la même efficacité. De plus ces matières absorbent les huiles essentielles de la plante et peuvent ensuite les laisser volatiliser vers l'extérieur [1].

IV.5 Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances extrêmement puissantes, pouvant concentrer jusqu'aux 100 fois certains principes actifs de la plante [2]. Il y a plusieurs méthodes d'extractions des H.Es citées dans la littérature (voir la partie bibliographique). L'hydrodistillation représente la méthode usuelle. 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.

IV.6 Principe de l'hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation est le suivant [3] :

- 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.

IV.7 Description de la technique d'hydrodistillation

La matière végétale est introduite dans un ballon de six(6) litres après avoir été coupée en petits morceaux avec quatre(4) litres d'eau. La mise en marche du chauffage se fait à douce ébullition. Le réfrigérant est mis en fonction en réglant le débit d'eau. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'hydrolat par décantation. La récupération de cette huile essentielle (pour l'analyse chromatographique) est effectuée du haut de l'essencier, à l'aide d'une pipette pasteur.

Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'être retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant (sulfate de magnésium anhydre) : C'est l'opération de séchage. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des piluliers en verre ambré et conservée au congélateur jusqu'à l'analyse.

.Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessous (**Fig. 26**).



Fig. 26 : Montage d'hydrodistillation (Appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne [4]).

IV.8 Détermination des rendements des huiles essentielles

Le rendement de l'huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenu et la masse du matériel végétale à traiter. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R^{dt\%} = M/M_0 * 100$$

$R^{dt\%}$: Le rendement des huiles essentielles.

M : la masse d'huile essentielle récupéré (g).

M_0 : la masse de matière végétale (g)

IV.9 Analyse des huiles essentielles des *Pinus* par CPG et CPG/SM

L'huile obtenue après l'hydrodistillation est soumise à l'analyse CPG et CPG/SM, ces méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants [5].

❖ Analyse quantitative par CPG

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 programmée de 60°C à 230°C à raison d'une montée de 2°C/min et ensuite maintenue à 230°C pendant 35min. 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 (1mL/min), le volume d'injection de l'échantillon est de 0.2 μL .

❖ Analyse qualitative par CPG/SM

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 des spectres de masse ont été acquis sur la masse gamme 35-350 Da (temps de balayage : 1s). La colonne utilisée est RTX-1, capillaire en silice fondue. Les autres conditions étaient les mêmes que celles décrites ci-dessus sauf pour le gaz vecteur l'Hélium de mode d'injection split est de rapport de fuite de 1/80.

❖ Méthodologie

La méthodologie d'analyse de laboratoire de Chimie des Produits Naturels CPN est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG associée à la détection par ionisation de flamme (FID) permettant le calcul des indices de rétention sur colonne polaire et sur colonne apolaire ainsi que la quantification des composés et du couplage en ligne CPG/SM qui permet d'obtenir le spectre de masse des composés individualisés. Selon l'objectif de l'analyse (routine ou recherche) et selon le taux d'élucidation, il faut procéder à un fractionnement de l'huile essentielle par chromatographie sur colonne ouverte. Les indices de rétention et les spectres ainsi obtenus sont comparés avec les données contenues dans une bibliothèque (« Arômes ») propre au laboratoire de Corse ou dans des bibliothèques commerciales (ou encore littérature) [6-8].

- Si le composé est présent parmi les références des bibliothèques du laboratoire, l'identification est immédiate et peut être considérée comme acquise.
- Si le composé est absent des bibliothèques du laboratoire alors deux cas se présentent :
(i) soit le composé est présent dans une bibliothèque commerciale et une structure, au moins, est proposée. Nous pouvons conclure de façon raisonnable quant à son identification après un examen détaillé des propositions : concordance des spectres de masse, bibliothèques utilisées, étude mécanistique des fragmentations, absence de co-élution, etc.

(ii) soit nous ne pouvons pas conclure de façon raisonnable, soit encore le composé est absent de toute les bibliothèques. Dans ces cas, l'identification nécessite de procéder à des analyses complémentaires. A ce stade, quatre types d'études peuvent être envisagés :

- Analyse à l'aide du couplage CPG/SM en mode ionisation chimique qui permet d'avoir des informations supplémentaires par rapport au mode de l'impact électronique, ne serait-ce que la masse molaire. En fait un certain nombre de pics caractéristiques sont toujours relevés

- Analyse par RMN du carbone-13

- Hémissynthèse du composé supposé et de ses isomères, les composés ainsi synthétisés sont soumis à l'analyse dans les conditions usuelles du laboratoire,

- Si aucune des études ci-dessus n'a été opérante, il ne reste d'autre ressource que la purification du composé afin de réaliser son analyse structurale.

IV.10 Etudes statistiques

Les analyses statistiques des compositions chimiques ont été réalisées en utilisant le logiciel statistique XLSTAT. Les analyses de données ont été effectuées en utilisant des Analyses en Composantes Principales (ACP) et par Classification Ascendante Hiérarchique (CAH).

Les deux méthodes visent à réduire l'espace multi varié dans lequel les objets (échantillons d'huiles essentielles) sont distribués mais sont complémentaires dans leur capacité à présenter les résultats [9]. En effet, l'APC fournit les données pour les diagrammes dans lesquels les deux objets (échantillons d'huiles essentielles) et les variables (composants d'huiles essentielles) sont tracés tandis que l'analyse canonique informe un arbre de classification dans lequel les objets (les emplacements d'échantillonnage) sont réunis. PCA a été réalisée en utilisant la fonction «PCA» à partir du logiciel statistique. Les variables (composants volatils) ont été sélectionnés en utilisant la fonction du logiciel de statistique. L'analyse de groupement a produit un dendrogramme (arbre) en utilisant la méthode de Ward de Clustering Hiérarchique, basée sur la distance euclidienne entre paires d'échantillons d'huile essentielle.

IV.11 Activités biologiques

IV.11.1 Activité antioxydante

✓ Piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl):

Le principe de cette méthode est sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène [10]. La réduction du DPPH[•] est contrôlée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde caractéristique (517 nm). A cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par l'antioxydant (AH) ou un autre radical, l'absorption diminue.

Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H⁺ (Fig.27).

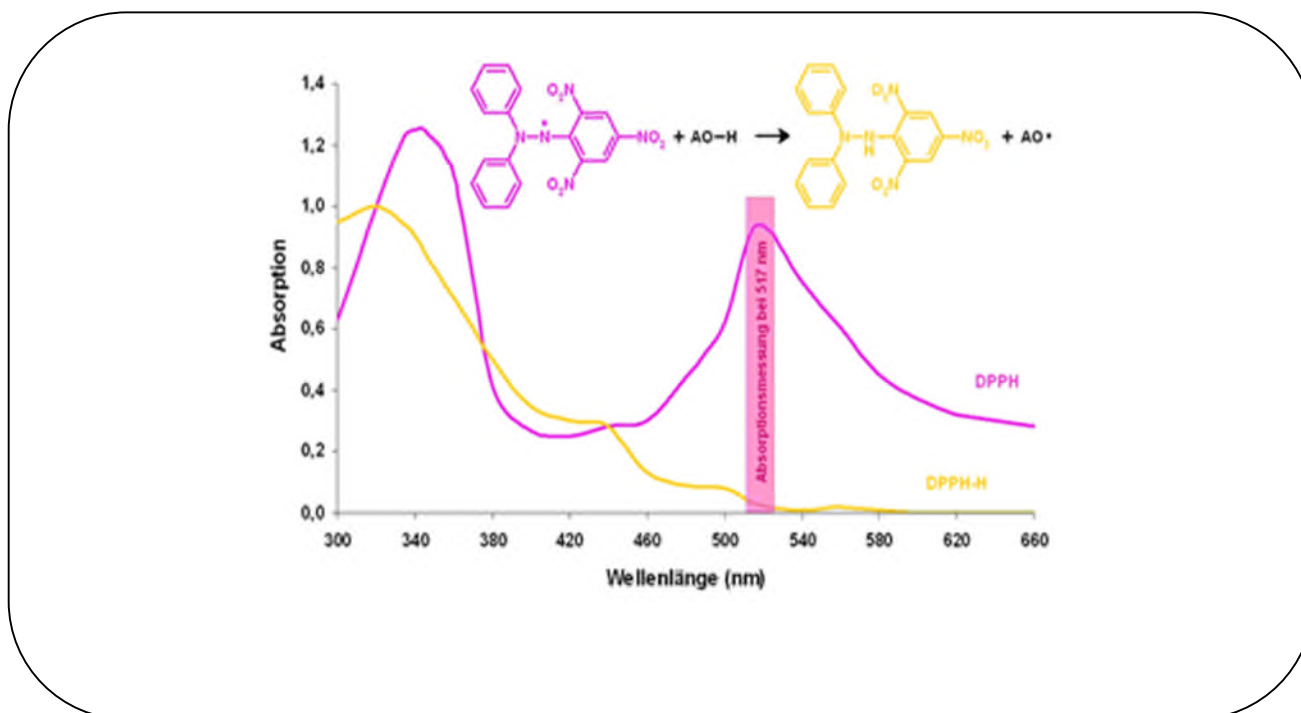


Fig.27 : Réaction du DPPH avec un antioxydant.

L'activité radicalaire de balayage de l'huile essentielle a été mesurée par la méthode légèrement modifiée décrite ci-dessous [11] :

1 ml de solution de DPPH[•] dans l'éthanol 0,006% est mélangé avec un volume égal d'extrait d'essai à différentes concentrations (0,04 à 0,2 mg/ml), la réaction est suivie pendant 180 min.

L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometer, Optizen POP).

- Le blanc est composé de 1ml de la solution éthanolique au DPPH[•] et de 1 ml 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 [12].
- Le contrôle négatif est l'éthanol

La diminution de l'absorbance de la solution DPPH[•] indique une augmentation de l'activité de piégeage des radicaux DPPH[•] (% d'inhibition). Cette activité, donnée en % de piégeage des radicaux DPPH[•], est calculée avec l'équation suivante [12] :

$$\% \text{ DPPH piégeage des radicaux libres} = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$$

A₀: absorbance du blanc (t = 0 min)

A : absorbance de la solution de l'échantillon testé à l'instant t.

❖ Calcul de l'IC₅₀

La 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.

✓ Réduction du Fer : FRAP

L'activité réductrice du fer des huiles essentielles est déterminée selon la méthode décrite par Benzie et al [13], basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺. Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations 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 K₃Fe(CN)₆ à 1%. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite ; 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes ; 2,5 ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

- ✓ La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc. Semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par

une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [14]. Le pouvoir réducteur d'un composé est associé à son pouvoir antioxydant, une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur [15,16].

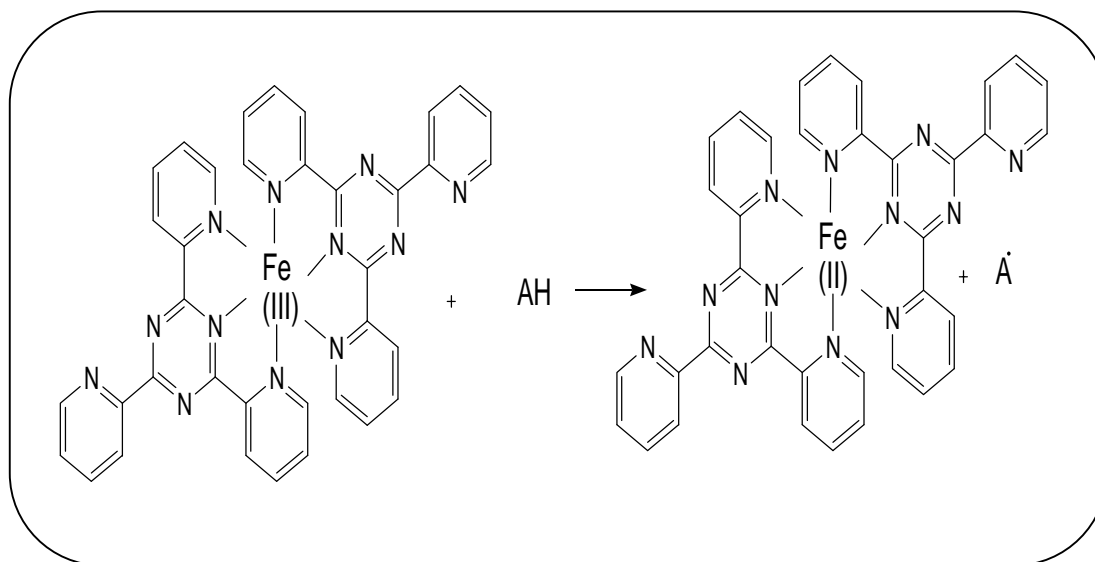


Fig.28 : Méthode de FRAP.

IV.11.2 Activité antimicrobienne

Douze souches microbiennes et trois levures sont choisies pour leur pathogénicité et leur implication fréquente dans la contamination des denrées alimentaires pour les unes et leur détérioration des bois d'œuvre et produits dérivés pour les autres.

Bactéries :

- ✓ à Gram-négatives :

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 ; *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ; *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 ; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ; *Enterobacter cloacae* ATCC13047 ; *Citrobacter freundii* ATCC 8090 ; *Proteus mirabilis* ATCC 35659.

- ✓ à Gram-positives

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Lysteria monocytogenes* ATCC 15313.

Levures :

Candida albicans ATCC 444, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 26790.

Les souches bactériennes et levures sont sous forme des lots “American Type Culture Collection” ATCC ; elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

- **Diamètre d’inhibition**

Les tests antimicrobiens ont été réalisés par la méthode de l’antibiogramme. Elle est basée sur la diffusion des substances à tester selon un gradient de concentration. Au cours de cette étude la méthode de diffusion des disques choisis pour réaliser le test est comme suit :

Des disques en papier filtre type wattman n°3, de 6 mm de diamètre ont été préparés et stérilisés à 121°C pendant 15 min. Ces disques ont été imprégnés par 10 µL des solutions de produits à tester (H.E). Les disques témoins sont imprégnés successivement par 10 µL de DMSO pur.

L’ensemencement est réalisé par inondation à partir d’un inoculum contenant 10^6 UFC/mL (cité ci-dessous). Ensuite, à l’aide d’une pince, les disques chargés par le produit à tester sont transférés dans la boîte inoculée. Les disques sont espacés de 24 mm centre à centre. L’incubation dure 18 à 24 H à 37°C. L’incubation a été prolongée de 12 H pour la souche *Enterococcus faecalis* à cause de sa croissance lente. La mesure des zones d’inhibition pour la lecture est effectuée à l’extérieur de la boîte fermée à l’aide d’une règle graduée. Elle est réalisée en prenant la moyenne de trois mesures différentes de diamètre.

- **Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

L’activité antimicrobienne a été évaluée à l’aide de la méthode de microdillution. Une dillution avec l’agar a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (MIC). Solutions en stock ont été obtenus par dissolution extrait de diméthylsulfoxyde (DMSO 1%). les dilutions en série ont été faites pour obtenir les concentrations allant de 0,2 à 10 mg/ml de l’huile essentielle. Chaque mélange a été ajouté pour Mueller-Hinton agar bacteria [16, 17]. Les boîtes de Pétri contenait une solution stérile de DMSO et le milieu de

culture, respectivement et incubé à 37°C. La tétracycline a servi de contrôle positif, tandis que le solvant (10% aqueuses DMSO) a été utilisé comme un contrôle négatif. Les expériences ont été réalisées en trois fois. Les valeurs des MIC sont exprimées en mg/mL.

REFERENCES

- [1] **Hammouchi Y.**, La thérapeutique par les plantes les plus connue en Algérie, **1999**, p. 101
- [2] **Bruneton J.**, Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales, 4eme Ed. Tec & Doc, Paris, **1999**, p.1288.
- [3] **Bagard S.**, Simon N., Physique-Chimie, Tout-en-un, Bréal, **2008**, p.128.
- [4] Council of Europe, Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A, Ed. Sainte Ruffine, France, **1996**.
- [5] **Arpino P.**, Prevot A., Sarbinet J., Tranchant J., Vergnol A., Wittier P., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Ed Masson Paris, **1995**.
- [6] **König W.A.**, Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of Mass Finder 2.1, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, **2001**.
- [7] **National Institute of Standards and Technology**, NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database, Gaithersburg, MD.[<http://webbook.nist.gov/chemistry>], **2005**.
- [8] **Adams R.P.**, Identification of Essential Oil Components by Gaz Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy, Allured Publishing: Carol Stream IL. **2001**.
- [9] **Massart D. L.**, Chemometrics: A Textbook. Elsevier Sciences: New York, **1998**.
- [10] **Sanchez-Moreno C.**, Larrauri Jose A., Saura-Calixto F., A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, 76(2): 270-276.
- [11] **Mighri H.**, Hajlaoui H., Akrouit A., Najjaa H., Neffati M., Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie*, **2010**, 13: 380–386.
- [12] **Molyneux P.**, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH[•]) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn. Journal of Science and Technology*, **2004**, 26 (2): 211-219.
- [13] **Oyaizu M.**, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, **1986**, 44: 307–315.

[14] **Benzie** I.F., Strain J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **1996**, 239(1) : 70-76.

[15] **Hubert** J., Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, Spécialité : Qualité et sécurité des aliments, **2006**,

[16] **Chikhi** I., Composition Chimique Et Activites Biologiques Des Extraits De Cinq Plantes Aromatiques Et Medicinales De L'ouest D'algerie, Thèse de Doctorat université de Tlemcen, **2013**.

[17] **Ganière** J.-P., Mangion C. et Péridy M., Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. *Revue Médicale*, **2004**.

Chapitre V

CHAPITRE V : Analyse chimique des huiles essentielles du genre *pinus*

V.1 Introduction

Les huiles essentielles du genre *Pinus* sont très utilisées en cosmétique, parfumerie et dans les industries agroalimentaires [1].

Dans cette partie, nous reportons les résultats d'une étude faite sur différentes espèces du genre *Pinus* d'Algérie (*halepensis*, *pinea* et *pinaster*) et qui a pour objectif la contribution à la valorisation des huiles essentielles des plantes étudiées, qui généralement posent de sérieux problèmes de normalisation pour leurs commercialisations, à cause de la grande diversité de leurs compositions, reconnues par l'ensemble des scientifiques et utilisateurs.

La variation de la composition chimique des huiles essentielles peut être due à de nombreux facteurs. Des travaux de recherche ont montré que la composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. En effet, elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol, climat, etc...) ou technologiques (mode de culture ou d'extraction d'huile essentielle de la plante) [2,3].

Pour cela, nous avons entrepris une étude pour évaluer la variation de la composition chimique de l'huile essentielle en fonction de la partie de la plante étudiée, la période de récolte, le lieu et la durée de conservation de la matière végétale. Ces travaux ont généralement permis de mettre en évidence l'influence de quelques facteurs sur la teneur et la qualité des huiles essentielles.

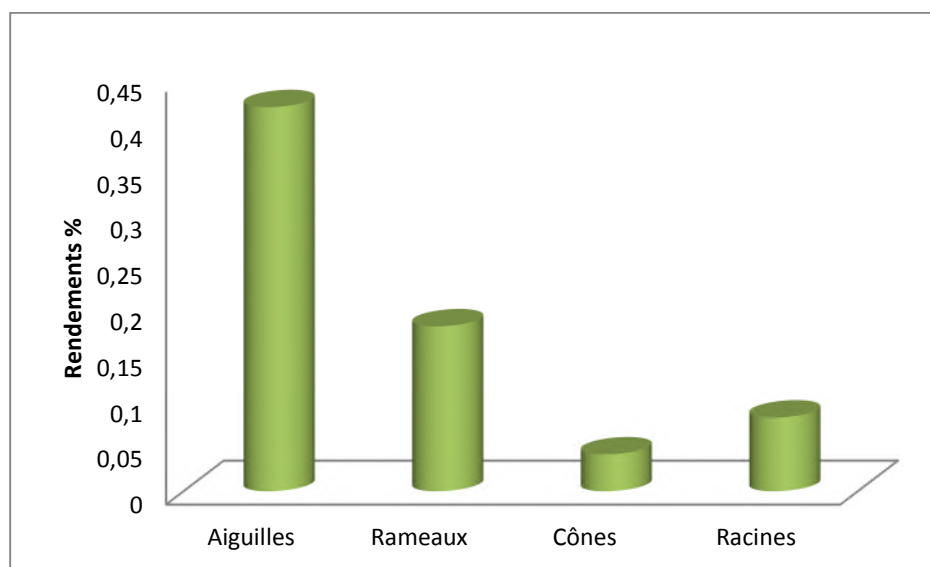
V.2 Huiles essentielles de *Pinus halepensis*

V.2.1 Huiles essentielles de différentes parties de *Pinus halepensis*

Le matériel végétal utilisé dans cette étude (rameaux, aiguilles, cônes et racines), a été récolté de la région de Nedroma durant les mois de Mars 2010. L'identification botanique a été effectuée par le **Pr. Benabadji**, Laboratoire de Botanique de l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen. Le matériel végétal frais a été hydrodistillé pendant 5 heures en utilisant un appareil de type Clevenger [4] pour obtenir une huile essentielle de couleur jaune pale.

- **Rendement des huiles essentielles**

Le rendement d'hydrodistillation est de 0.42%, 0.18%, 0.04% et 0.09% pour les aiguilles, les rameaux, les cônes et les racines respectivement par rapport à la matière fraîche. La méthodologie ainsi que les différentes quantités utilisées sont décrites dans la partie expérimentale.



Histogramme 01 : Rendements en huiles essentielles en fonction de la partie de la plante.

- **Composition chimique des huiles essentielles du *P.halepensis***

Après extraction par hydrodistillation des différentes parties, la composition des huiles essentielles a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse à ionisation de flamme (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Le mode opératoire est détaillé dans la partie expérimentale. Leurs indices de rétention et les concentrations relatives sont présentés dans le **Tableau 05**.

- ❖ L'analyse des huiles essentielles des aiguilles, des rameaux, des cônes et des racines de *P.halepensis*, a permis d'identifier 41, 34, 33 et 12 composés respectivement, correspondant à 78.6%, 93.6 % ,74.4% et 98.7% de la composition chimique totale (**Tableau 05**).

- ❖ Les huiles essentielles de différentes parties de *P.halepensis* sont caractérisées par la prédominance des monoterpènes hydrocarbonés (aiguilles, rameaux, cônes, racines). Il est à noter que les constituants hydrocarbonés majoritaires pour chaque partie sont :

- Les aiguilles : Myrcène (22%) 6, α -Pinène (12.6 %) 2 et Trans-Caryophyllène (13,8%) 24.
- Les rameaux : Myrcène (37.3%) 6 et Trans-Caryophyllène (25.4%) 24.
- Les cônes : Myrcène (9.2%)6 et Trans-Caryophyllène (24,9%) 24.
- Les racines : α -Pinène (87,4%) 2.

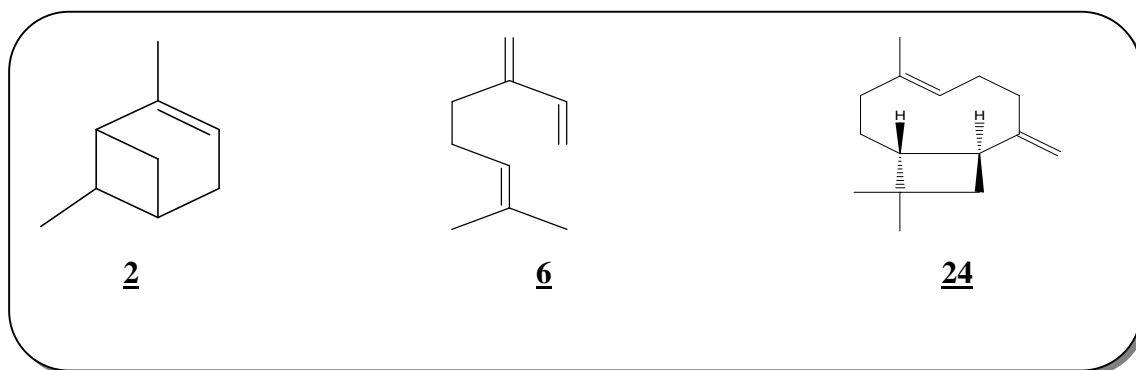


Fig. 29 : Composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *Pinus halepensis*.

Tableau 05 : Composition chimique des huiles essentielles des différentes parties de *Pinus halepensis*.

N°	Composés ^a	IR _{LIT} ^b	IR _a ^c	IR _p ^d	PHF	PHT	PHC	PHR	Identification
1	α -Thujène	922	923	1021	0,3	-	-	-	IR-SM
2	α -Pinène	931	932	1023	12,6	7,5	1,5	87,4	IR-SM
3	Camphène	943	944	1066	0,1	0,1	-	0,8	IR-SM
4	Sabinène	964	966	1118	2,8	0,1	-	-	IR-SM
5	β -Pinène	970	971	1108	1,1	0,5	0,2	1,3	IR-SM
6	Myrcène	970	983	1159	22	37,3	9,2	1	IR-SM
7	α -Phelandrène	997	998	1157	1,1	1,0	-	-	IR-SM
8	3-Carène	1005	1006	1147	0,2	-	0,6	1,5	IR-SM
9	α -Terpinène	1008	1010	1175	0,1	-	-	-	IR-SM
10	β -Phélandrene	1021	1021	1204	0,7	0,6	1,8	0,1	IR-SM
11	Limonène	1020	1021	1195	0,7	5,7	0,2	0,7	IR-SM
12	Z- β -Ocimène	1024	1025	1225	0,1	-	-	-	IR-SM
13	E- β -ocimène	1034	1036	1241	1,5	tr	-	-	IR-SM
14	γ -Terpinène	1047	1049	1237	0,5	0,1	-	-	IR-SM
15	Terpinolène	1078	1082	1247	4,4	0,2	0,5	0,4	IR-SM
16	Linalool	1080	1084	1529	0,2	0,2	0,3	-	IR-SM
17	cis-p-menth-2-en-1-ol	1108	1107	1600	0,1	-	0,2	-	IR-SM
18	Terpinène 4-ol	1161	1164	1583	1	-	-	-	IR-SM
19	α -Terpinolène	1179	1175	1688	0,1	-	0,4	0,1	IR-SM
20	Acétate de bornyle	1269	1268	1475	0,1	0,2	0,6	-	IR-SM
21	Acétate de Néryle	1342	1342	1409	-	0,1	-	-	IR-SM
22	Acétate de Géranyle	1361	1360	1740	0,1	0,1	0,3	-	IR-SM
23	α -Copaène	1379	1373	1475	0,1	0,2	-	0,3	IR-SM
24	Trans-Caryophyllène	1424	1418	1583	13,8	25,4	24,9	3,5	IR-SM
25	α -Humulène	1456	1449	1651	0,1	4,5	5,0	0,6	IR-SM
26	2-Phenylethyl isovanerate	1463	1468	1973	1,7	0,7	1,8	-	IR-SM
27	Germacrène -D	1480	1474	1692	0,2	0,7	1,1	0,3	IR-SM
28	α -Muuroolène	1496	1492	1709	0,2	0,5	0,5	0,8	IR-SM
29	δ -Cadinène	1516	1513	1738	0,2	0,2	0,6	-	IR-SM
30	E- α -Bisabolène	1532	1532	1740	0,2	0,1	-	-	IR-SM
31	Phenylethyl TiglateE	1547	1546	2141	0,2	0,1	-	-	IR-SM
32	Phenylethyl TiglateZ	1559	1568	2145	0,1	0,3	6,2	-	IR-SM
33	Oxide de Caryophyllène	1576	1583	1898	1,9	3,7	1,2	-	IR-SM
34	Guaiol	1591	1592	2070	0,3	0,6	-	-	IR-SM
35	Epoxyde de Humulène	1601	1613	2035	0,1	-	-	-	IR-SM
36	Epi-Cubénol	1624	1625	2043	0,5	-	-	-	IR-SM
37	Tau-Cadinol	1632	1633	2163	-	-	0,5	-	IR-SM

38	α -Cadinol	1645	1640	2163	0,1	0,1	-	-	IR-SM
39	Bulnésol	1659	1666	2195	-	0,3	-	-	IR-SM
40	Cembrène	1938	1940	2185	0,3	1,9	1,7	-	IR-SM,Ref
41	m-Camphorène	1947	1939	2234	0,3	0,1	1,7	-	IR-SM,Ref
42	Cembrène A	1962	1951	2227	0,5	0,1	0,3	-	IR-SM,Ref
43	p-Camphorène	1980	1974	1987	0,1	0,1	0,4	-	IR-SM,Ref
44	Geranyl Linalool	2037	2037	2540	7,9	0,3	0,4	-	IR-SM,Ref
45	Isopimara-3,15-diène	2004	2010		-	-	0,7	-	IR-SM
46	abeita-8,12-diène	2010	2046		-	-	0,4	-	IR-SM
47	abeitatridiène	2034	2046		-	-	0,4	-	IR-SM
48	abeita-6,13-diène	2084	2072		-	-	1,0	-	IR-SM
49	abeita-8(14) ,13(15)-diene	2133	2152		-	-	1,4	-	IR-SM
50	n-Docosane	2209	2199	2197	-	-	7,1	-	IR-SM
51	n-Tricosane	2301	2299	2300	-	-	1,3	-	IR-SM
Taux d'identification %					78,6	93,6	74,4	98,7	
Composés hydrocarbonés (%)					64.2	86.9	50.2	98.6	
Monoterpènes hydrocarbonés (%)					48.2	53.1	14.0	93.1	
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)					14.8	31.6	32.1	5.5	
Diterpènes hydrocarbonés (%)					1.2	2.2	4.1	-	
Composés oxygénés (%)					14.4	6.7	24.2	0.1	
Monoterpènes oxygénés (%)					1.6	0.6	1.8	0.1	
Sesquiterpènes oxygénés (%)					2.9	4.7	1.7	-	
Composés oxygénés non-terpeniques (%)					2.0	1.1	8.0	-	
Diterpènes oxygénés (%)					7.9	0.3	0.4	-	
Autres composés (%)					-	-	12,3	-	

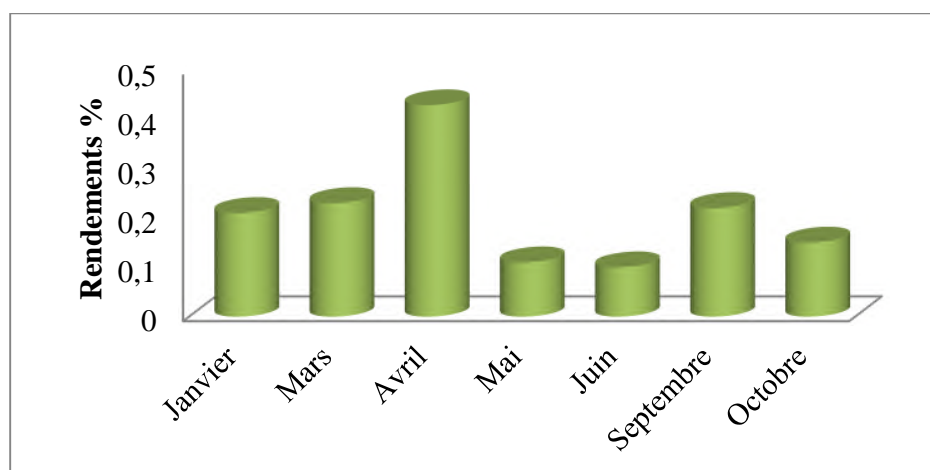
^a Ordre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1), RI_{Lit} ^b: indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés par König et Coll., 2001 et NIST, 2005 [5,6], RI a ^c : indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax, IR : indices de rétention, SM : spectrométrie de masse en mode impact électronique, % : Pourcentages des composés, Réf : Composés identifiés à partir des données de la littérature König et Coll., 2001 [5], tr : trace (<0.05%), PHA : les aiguilles de *Pinus halepensis*, PHT : les rameaux de *Pinus halepensis*, PHC : les cônes de *Pinus halepensis*, PHR: les racines de *Pinus halepensis*.

V.2.2 Effet du cycle végétatif sur le rendement et la composition de l'huile essentielle

Cette étude a été faite sur la partie aérienne de *P.halepensis* récoltée en Janvier, Mars, Avril, Mai, Juin, Septembre et Octobre 2012 de la région de Nedroma.

V.2.2.1 Caractéristiques chimiques

La variation du rendement en huile essentielle des parties aériennes de *P.halepensis* est représentée sur la Figure ci-dessous.



Histogramme 02 : Rendements en huile essentielle en fonction de la période de récolte.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons l'extrême diversité des valeurs enregistrées pour les différentes périodes de cueillettes. Pendant le mois de Janvier, le rendement en huile essentielle était de 0,21 %. Au mois d'avril, il a augmenté pour atteindre 0,43 % (pleine floraison).

V.2.2.2 Composition chimique

L'analyse des huiles essentielles des parties aériennes de *P.halepensis* durant les différents stades végétatifs nous a permis l'identification de 49 composés. Parmi ces derniers, 26 monoterpènes, 15 sesquiterpènes, 5 diterpènes et trois composés oxygénés non terpéniques (**Tableau 06, Fig.30**).

Tableau 06 : Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. halepensis* en fonction de son stade de développement.

N°	Composés ^a	IR _{Lit} ^b	IR _a ^c	IR _p ^d	PHCI	PHC2	PHC3	PHC4	PHC5	PHC6	PHC7	Identification
1	α -Thujène	922	923	1021	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	IR-SM
2	α -Pinène	931	932	1023	23	10,4	17,2	37,6	8,3	16,8	15,5	IR-SM
3	Camphène	943	944	1066	0,3	2	0,2	0,5	0,1	0,2	0,2	IR-SM
4	Sabinène	964	966	1118	4,4	-	2,9	tr	1,4	0,8	0,8	IR-SM
5	β -Pinène	970	971	1108	2,3	0,9	1,7	2,4	0,9	1,5	1,3	IR-SM
6	Myrcène	970	983	1159	30,2	17,3	24,4	1,3	16,3	34,2	31,3	IR-SM
7	α -Phelandrène	997	998	1157	tr	-	1,6	-	1,0	tr	tr	IR-SM
8	3-Carène	1005	1006	1147	2,1	0,7	0,2	0,2	0,1	2,2	1,6	IR-SM
9	α -Terpinène	1008	1010	1175	0,4	0,1	0,9	tr	0,8	0,6	0,7	IR-SM
10	m-Cymène	1010	1012	1259	0,5	0,5	1,7	-	-	0,1	1,3	IR-SM
11	β -Phélandrène	1021	1021	1204	0,7	0,6	tr	1,1	0,6	1,5	tr	IR-SM
12	Limonène	1020	1021	1195	1	0,6	tr	0,8	0,6	0,9	1,3	IR-SM
13	Z- β -Ocimène	1024	1025	1225	tr	tr	0,8	tr	tr	0,1	tr	IR-SM
14	E- β -Ocimène	1034	1036	1241	0,7	0,6	-	tr	0,2	1,4	1,0	IR-SM
15	γ -Terpinène	1047	1049	1237	0,1	0,3	0,4	tr	0,2	1,1	0,4	IR-SM
16	Terpinolène	1078	1082	1247	6,1	2,6	3,5	0,2	1,9	-	2,6	IR-SM
17	Linalool	1080	1084	1529	0,1	0,3	0,2	0,1	0,5	5,1	0,6	IR-SM
18	Perillène	1090	1099	1414	0,1	0,1	tr	-	tr	1,0	0,2	IR-SM Ref
19	Cis-p-menth-2-èn-1-ol	1108	1107	1600	0,1	0,1	0,1	-	0,2	0,1	0,1	IR-SM
20	Trans-p-menth-2-èn-1-ol	1113	1117	1612	0,1	0,1	-	0,1	tr	0,1	0,1	IR-SM
21	Terpinène-4-ol	1161	1164	1583	1,9	2,2	2,9	0,1	4,4	3,0	2,7	IR-SM
22	α -Terpinolène	1179	1175	1688	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	1,3	1,0	IR-SM
23	Acétate de bornyle	1269	1268	1475	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	IR-SM
24	Acétate de citronéllyle	1331	1333	1645	tr	0,7	tr	0,1	tr	tr	tr	IR-SM
25	Acétate de Néryle	1342	1342	1409	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	IR-SM
26	Acétate de Géranyle	1361	1360	1740	tr	0,1	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	IR-SM
27	α -Copaène	1379	1373	1475	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	IR-SM
28	Trans-Caryophyllène	1424	1418	1583	7,8	10,3	10,6	9,4	15,3	10,8	14,1	IR-SM
29	α -Humulène	1456	1449	1651	4,5	2,2	2,0	1,5	3	1,9	2,6	IR-SM
30	2-Phényléthyl isovanérate	1463	1468	1973	1,0	2	1,6	0,1	1,6	1,2	11,5	IR-SM
31	GermacrèneD	1480	1474	1692	9,1	27,8	15,8	0,1	18,8	8,2	0,5	IR-SM
32	α -Muuroène	1496	1492	1709	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	IR-SM
33	δ -Cadinène	1516	1513	1738	0,2	0,2	0,2	0,6	0,1	0,2	0,2	IR-SM
34	E- α -Bisabolène	1532	1532	1740	0,1	0,3	0,2	0,4	tr	0,1	tr	IR-SM
35	Phényléthyl TiglateE	1547	1546	2141	-	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	IR-SM
36	Phényléthyl TiglateZ	1559	1568	2145	0,1	tr	tr	0,3	0,1	0,7	1,4	IR-SM
37	Oxide de Caryophyllene	1576	1583	1898	1,1	3,3	2,9	0,2	7,4	0,1	0,4	IR-SM

Chapitre V : Analyse chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*

38	Guaiol	1591	1592	2070	0,2	0,7	0,5	-	1,1	0,3	0,2	IR-SM
39	Epoxyde de humulène	1601	1613	2035	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	tr	IR-SM
40	Epi-CubénoI	1624	1625	2043	0,1	0,2	tr	0,1	0,2	0,1	0,1	IR-SM
41	Tau-Cadinol	1632	1633	2163	-	0,3	tr	0,1	0,3	0,1	0,2	IR-SM
42	T-MuuroIol	1634	1638	2141	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	IR-SM
43	α -Cadinol	1645	1640	2163	-	0,4	0,1	-	0,3	0,1	0,2	IR-SM
44	Bulnésol	1659	1666	2195	-	tr	-	-	tr	-	-	IR-SM
45	Cembrène	1938	1940	2185	0,1	0,1	0,1	tr	0,4	0,2	0,1	IR-SM,Ref
46	m-Camphorène	1947	1939	2234	0,1	0,2	0,1	-	0,2	0,4	0,5	IR-SM,Ref
47	Cembrene A	1962	1951	2227	-	0,1	0,2	tr	-	0,1	0,1	IR-SM,Ref
48	p-Camphorène	1980	1974	1987	tr	Tr	-	0,1	tr	0,1	0,1	IR-SM,Ref
49	Géranyle Linalool	2037	2037	2540	0,5	5,8	2,2	3,1	3,5	0,9	1,4	IR-SM,Ref
Taux d'identification					99,7	95,5	96,6	62,2	91,8	98,6	97,7	
Composés hydrocarbonés (%)					94,1	78,4	85,4	57,2	71,1	85,2	77,8	
Monoterpènes hydrocarbonés (%)					72,0	36,9	55,9	44,6	32,7	62,9	59,2	
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)					21,9	41,1	29,1	12,5	37,8	21,5	17,8	
Diterpènes hydrocarbonés(%)					0,2	0,4	0,4	0,1	0,6	0,8	0,8	
Composés oxygénés(%)					5,6	17,1	11,2	5	20,7	13,4	19,9	
Monoterpènes oxygénés (%)					2,5	3,8	3,6	0,8	5,7	9,6	4,2	
Sesquiterpènes oxygénés (%)					1,5	5,2	3,6	0,6	9,5	0,9	1,2	
Composés oxygénés non-terpéniques (%)					1,1	2,3	1,8	0,5	2,0	2,0	13,1	
Diterpènes oxygénés (%)					0,5	5,8	2,2	3,1	3,5	0,9	1,4	

^aOrdre d'éluion est donné sur colonne apolaire (Rtx-1), ^b: indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005 [5,6], ^c: indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1, ^d indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column
 IR : indices de rétention, S M: spectre de masse en mode impact électronique, Ref : Composés identifiés à partir des données de la littérature
 König et Coll., 2001[5], PHC1 : *Pinus halepensis* récolté au mois du Janvier, PHC2 : *Pinus halepensis* récolté au mois de Mars, PHC3 : *Pinus halepensis* récolté au mois d'Avril, PHC4 : *Pinus halepensis* récolté au mois de Mai, PHC5 : *Pinus halepensis* récolté au mois de Juin, PHC6 : *Pinus halepensis* récolté au mois de Septembre, PHC7 : *Pinus halepensis* récolté au mois d'Octobre.

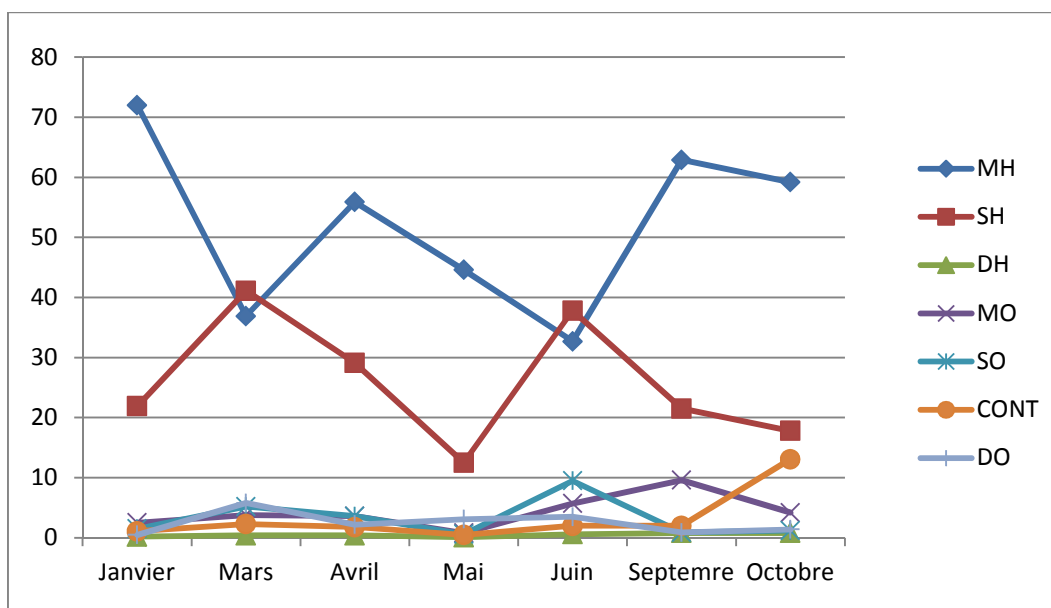


Fig. 30 : Pourcentage des principales classes de composé de *P.halepensis* en fonction de cycle végétatif.

MH : Monoterpènes hydrocarbonés, SH : Sesquiterpènes hydrocarbonés, DH :Diterpènes hydrocarbonés, MO : Monoterpènes oxygénés, Sesquiterpènes oxygénés, CONT : Composés oxygénés non terpéniques, DO : Diterpènes oxygénés

Selon nos résultats, il semble que la composition chimique de l'huile essentielle de *P. halepensis* varie de manière significative avec les stades physiologiques de la plante.

Nous remarquons que :

- Au début du cycle végétatif (Mois de Janvier), les groupes chimiques les plus abondants de cette huile étaient les composés monoterpéniques hydrocarbonés (72.0%), les sesquiterpènes hydrocarbonés (21.9%), les monoterpènes oxygénés (2,5 %). Les principaux monoterpènes hydrocarbonés sont : Myrcène (30.2%), α -Pinène (23 %), Terpinolène (6.1%), Sabinène (4.5%). Les sesquiterpènes hydrocarbonées étaient représentés par Trans-Caryophyllène (7.8%), α -Humulène (4.4%) et Germacrène D (9.1%).
- Au début du stade de la floraison (Mois de Mars), la composition de l'huile essentielle est similaire d'un point de vue qualitatif à celle observée dans le début du cycle

végétatif. L'huile essentielle de cette période est caractérisée par un pourcentage élevé de sesquiterpènes hydrocarbonés (41,1%), et un pourcentage des monoterpènes hydrocarbonés plus petit (36,9%) que le premier.

V. 2.3 Variabilité chimique inter – stations des huiles essentielles de *Pinus halepensis*

Dans le but de déceler une éventuelle spécificité régionale ou micro-régionale en vue d'une valorisation des huiles étudiées. On a entrepris une étude autour de la variabilité chimique des huiles essentielles de *P. halepensis* dans différentes régions de l'ouest d'Algérie.

Les résultats des analyses des compositions chimiques des huiles essentielles des parties aériennes totales sont repris dans le **tableau 07**. Au total, 49 composés ont été identifiés. Ces composés représentent 97.9 % de la composition chimique globale. Bien que les profils chromatographiques des 10 huiles essentielles des parties aériennes contiennent les mêmes types de composés, il y avait des différences significatives dans les concentrations des principaux composants (**Tableau 07**).

Tableau 07 : Composition chimique des huiles essentielles de *P.halepensis* dans diverses localités de l'ouest Algérien.

N°	Composés ^a	IR _{LIT} ^b	IR _a ^c	IR _p ^d	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	Min ^f	Max ^g	Identification ^h
1	α -Thujène	922	923	1021	0,4	0,7	1.0	0,9	0,8	0,6	0,4	0,5	0,5	0,9	0,7	0,4	1.0	IR-SM
2	α - Pinène	931	932	1023	21,2	12,2	14	14,4	13,5	13,6	18	24,5	23,4	12,7	16,8	12,2	24,5	IR-SM
3	Camphène	943	944	1066	0,3	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	IR-SM
4	Sabinène	964	966	1118	1,5	3,5	6,0	6,3	6,2	5,9	2,3	3,0	2,0	5,2	4,2	1,5	6,3	IR-SM
5	β -Pinène	970	971	1108	1,9	1,7	2,0	1,8	1,9	1,9	1,8	2,2	2,0	2,0	1,9	1,7	2,2	IR-SM
6	Myrcène	970	983	1159	32,0	28,5	28,0	15,2	24,3	23,5	25,3	24,3	27,0	24,1	25,2	15,2	32,0	IR-SM
7	α -Phelandrène	997	998	1157	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	0,2	0,1	-	0,2	IR-SM
8	3-Carène	1005	1006	1147	1,6	0,6	1,0	1,2	1,2	5,5	0,7	0,7	1,4	2,0	1,6	0,6	5,5	IR-SM
9	α -Terpinène	1008	1010	1175	0,1	0,9	1,0	1,2	1,8	1,3	0,2	0,6	0,2	1,6	0,9	0,1	1,8	IR-SM
10	m-Cymène	1010	1012	1259	0,7	0,5	0,2	0,4	1,8	0,4	0,8	0,6	0,3	0,5	0,6	0,2	1,8	IR-SM
11	β -Phélandrène	1021	1021	1204	0,8	1,1	1,1	1,0	1,2	1,3	0,7	0,9	0,7	1,4	0,4	0,43	1,4	IR-SM
12	Limonène	1020	1021	1195	0,6	0,8	1,0	1,0	1,2	1,4	0,7	0,7	0,8	1,1	0,9	0,6	1,4	IR-SM
13	Z- β -Ocimène	1024	1025	1225	1,23	0,1	0,1	tr	-	0,1	tr	0,1	1,4	tr	0,4	-	1,4	IR-SM
14	E- β -Ocimène	1034	1036	1241	0,9	0,7	2,0	0,6	1,4	1,4	0,9	3,4	2,5	0,52	1,4	0,52	3,4	IR-SM
15	γ -Terpinène	1047	1049	1237	0,2	1,7	2,0	2,0	1,8	2,1	0,4	1	0,4	2,6	1,4	0,2	2,6	IR-SM
16	Terpinolène	1078	1082	1247	1,8	9,4	10,6	13,1	11,0	11,3	2,7	5,8	3,4	13,8	8,3	1,8	13,8	IR-SM
17	Linalool	1080	1084	1529	0,1	0,3	0,2	0,8	0,5	0,8	0,4	0,2	0,3	0,4	0,4	0,1	0,8	IR-SM
18	Perillène	1090	1099	1414	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	0,1	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	IR-SM Ref
19	Cis-p-ménth-2-èn-1-ol	1108	1107	1600	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	IR-SM
20	Trans-p-ménth-2-èn-1-ol	1113	1117	1612	tr	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	0,2	IR-SM
21	Terpinène-4-ol	1161	1164	1583	1,7	7,1	3,9	4,7	5,0	5,8	2,2	2,5	1,0	8,2	4,2	1,0	8,2	IR-SM
22	α -Terpinolène	1179	1175	1688	tr	0,5	0,4	0,4	0,7	0,1	0,1	0,4	tr	0,1	0,3	tr	0,7	IR-SM
23	Acétate de bornyle	1269	1268	1475	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,3	IR-SM

Chapitre V : Analyse chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*

24	Acétate de citronélyl	1331	1333	1645	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	tr	0,1	tr	0,1	IR-SM
25	Acétate de Néryl	1342	1342	1409	tr	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,2	IR-SM
26	Acétate de géranyl	1361	1360	1740	0,2	0,1	tr	0,2	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	tr	0,5	IR-SM
27	α -Copaène	1379	1373	1475	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	IR-SM
28	Trans-Caryophyllène	1424	1418	1583	13,9	11,1	7,0	9,2	8,2	9,4	17,1	11,0	14,6	7,8	10,9	7,0	17,1	IR-SM
29	α -Humulène	1456	1449	1651	2,6	2,2	1,3	1,9	1,5	1,6	3,4	2,2	2,8	1,4	2,1	1,3	3,4	IR-SM
30	2-Phényléthyl isovalérate	1463	1468	1973	5,4	7,5	10,9	10,5	10,3	4,8	6,7	4,9	7,0	8,7	7,7	4,8	10,9	IR-SM
31	Germacrène D	1480	1474	1692	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	IR-SM
32	α -Muuroène	1496	1492	1709	0,6	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	0,2	0,1	0,5	0,2	0,2	tr	0,6	IR-SM
33	δ -Cadinène	1516	1513	1738	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3	tr	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	tr	0,5	IR-SM
34	E- α -Bisaboène	1532	1532	1740	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	IR-SM
35	Phényléthyl TiglateE	1547	1546	2141	tr	0,1	0,2	0,2	0,1	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,2	IR-SM
36	Phényléthyl TiglateZ	1559	1568	2145	0,2	0,8	0,5	0,9	tr	0,3	3,3	tr	0,2	0,4	-	tr	-	IR-SM
37	Oxide caryophyllène	1576	1583	1898	1,6	0,2	0,5	0,7	0,4	0,3	0,8	0,9	2,2	0,2	0,8	0,2	2,2	IR-SM
38	Guaiol	1591	1592	2070	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,5	0,5	0,4	0,1	0,2	0,1	0,5	IR-SM
39	Humulène époxyde	1601	1613	2035	tr	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	IR-SM
40	Epi-Cubénol	1624	1625	2043	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,2	IR-SM
41	Tau-Cadinol	1632	1633	2163	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	IR-SM
42	T-Muurolol	1634	1638	2141	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	IR-SM
43	α -Cadinol	1645	1640	2163	0,2	0,1	tr	0,3	0,2	tr	0,3	0,3	tr	0,1	0,2	tr	0,3	IR-SM
44	Bulneéol	1659	1666	2195	-	-	-	0,1	-	-	tr	-	-	tr	0,1	-	0,1	IR-SM
45	Cembrène	1938	1940	2185	0,8	0,2	0,1	0,9	0,1	0,1	0,1	1,6	0,1	0,1	0,4	0,1	1,6	IR-SM
46	m-Camphorène	1947	1939	2234	0,4	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	-	0,2	-	0,4	IR-SM,Ref
47	Cembrène A	1962	1951	2227	0,3	0,1	tr	tr	tr	0,2	0,1	tr	0,1	-	0,1	-	0,3	IR-SM,Ref
48	p-Camphorène	1980	1974	1987	0,1	0,1	tr	0,4	tr	tr	1,1	0,1	0,1	-	0,3	-	1,05	IR-SM,Ref
49	Géranyl Linalool	2037	2037	2540	2,0	1,3	1,4	3,0	2,0	1,2	0,8	2,3	1,3	-	1,5	-	3	IR-SM,Ref
	Taux d'identification				97,4	96,7	98,9	96,4	99,8	97,2	94,5	97,7	98,8	98,1				

Composés hydrocarbonés (%)	85,23	78.0	80.0	73,5	79,9	82,5	78,15	85.0	85,4	79,0	
Monoterpènes hydrocarbonés (%)	65,3	63,1	70,6	59,8	69,1	70,7	55,3	69,1	66,3	68,9	
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)	18,3	14,4	9,2	12,1	10,5	11,4	21,5	13,9	18,7	10,0	
Diterpènes hydrocarbonés (%)	1,6	0,5	0,2	1,6	0,3	0,4	1,4	2,0	0,4	0,1	
Composés oxygénés (%)	6,6	10,3	7,3	11,3	9,5	9,6	6,1	7,7	6,1	9,9	
Monoterpènes oxygénés (%)	2,3	8,3	4,8	6,6	6,4	7,6	3,1	3,3	1,7	9,2	
Sesquiterpènes oxygénés (%)	2,3	0,7	1,1	1,7	1,1	0,8	2,2	2,1	3,1	0,7	
Diterpènes oxygénés (%)		2,0	1,3	1,4	3,0	2,0	1,2	0,8	2,3	1,3	-
Composés oxygénés non Terpénique (%)	5,6	8,4	11,6	11,6	10,4	5,1	10,2	5,0	7,3	9,2	

^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1), ^b Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RI_{LIT}), ^c Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RI a). ^d indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp), tr = trace (<0.05%), les stations: Nedroma (S1), Hwanet (S2), Oued tlata (S3), Bab Taza (S4), Bab el assa (S5), Sidi youchae (S6), Agadir (S7), Amieur (S8), Mansourah (S9), Ghazaouet (S10), ^e HE coll huile essentielle collective, Min ^f Valeur minimale, Max ^g Valeur maximale, Ref : Les Composés identifiés à partir des données de la littérature König et Coll., 2001 [5].

L'analyse en composantes principales (ACP) et la classification hiérarchique ascendante (CHA) étaient appliquées pour identifier les relations possibles entre les compositions des huiles essentielles et les origines géographiques des échantillons.

La CHA pour les huiles essentielles des parties aériennes (S1-S10) permet de distinguer 2 groupes d'échantillons. Le premier groupe (**I**) comprend six échantillons d'huile, et le second groupe (**II**) contient quatre échantillons de l'huile.

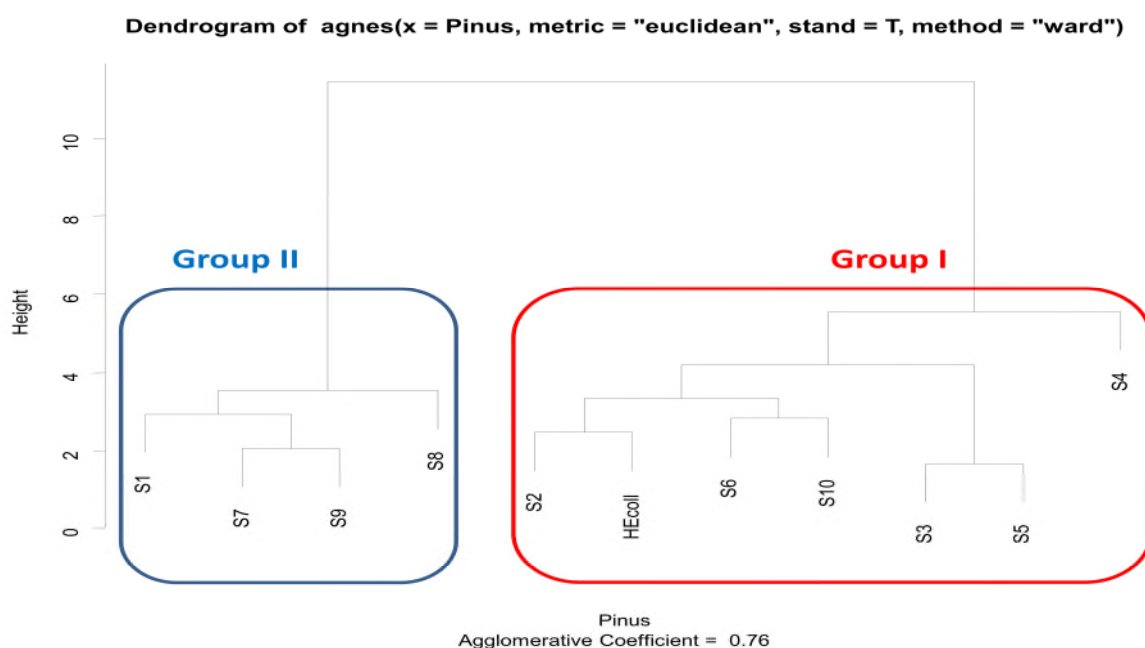


Fig.31 : CHA des compositions chimiques de *P. halepensis* de l'ouest Algérien.

L'ACP (**fig.32**) confirme les résultats de la CHA et met en évidence les principales différences d'ordre quantitatif entre les 2 groupes de composition chimique. Les composés discriminants pour le premier groupe sont Sabinène **C4**, Terpinolène **C16**, Terpinène-4-ol **C21** et 2-phénylethyleisovalerate **C30**. Cependant les composés discriminants pour le deuxième groupe sont : α -Pinene **C2**, le Myrcène **C6** et (E)- β - Caryophyllène **C28**.

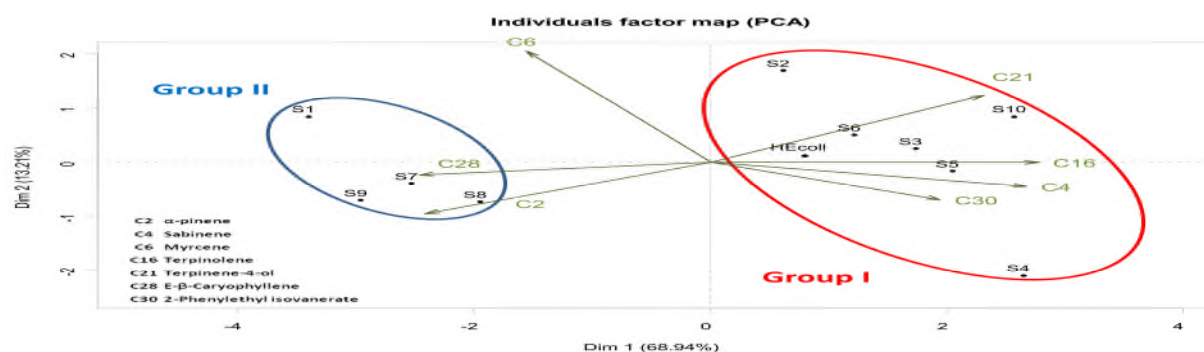

 Fig.32 : ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *Pinus halepensis*.

 Tableau 08 : Regroupement des échantillons de *P.halepensis* de l'analyse statistique

N ^a	Composés	Groupe I (S2-S6, S10)		Groupe II (S1-S7-S9)	
		Variation ^b	Moyenne ^b	Variation ^b	Moyenne
Monoterpènes hydrocarbonés			54.39		54.55
C2	α-Pinène	12.2-14.4	13.4	18.0-24.5	21.8
C4	Sabinène	3.5-6.3	5.5	1.5-3.0	2.2
C6	Myrcène	15.2-28.5	23.9	24.1-32.0	27.2
C16	Terpinolène	9.4-13.8	11.5	1.8-5.8	3.4
Monoterpènes Oxygénés			5.8		1.9
C21	Terpinène-4-ol	3.9-8.2	5.8	1.0-2.5	1.9
Sesquiterpènes hydrocarbonés			8.8		
C28	E-β-Caryophyllène	7.0-11.1	8.8	11.0-17.1	14.2
composés Non-terpéniques			10.1		5.8
C30	2-Phényléthyl isovanérate	8.7-10.9	10.1	4.8-7.0	5.8

^a La numérotation se rapporte à ceux du tableau 7, ^b pourcentage des composés

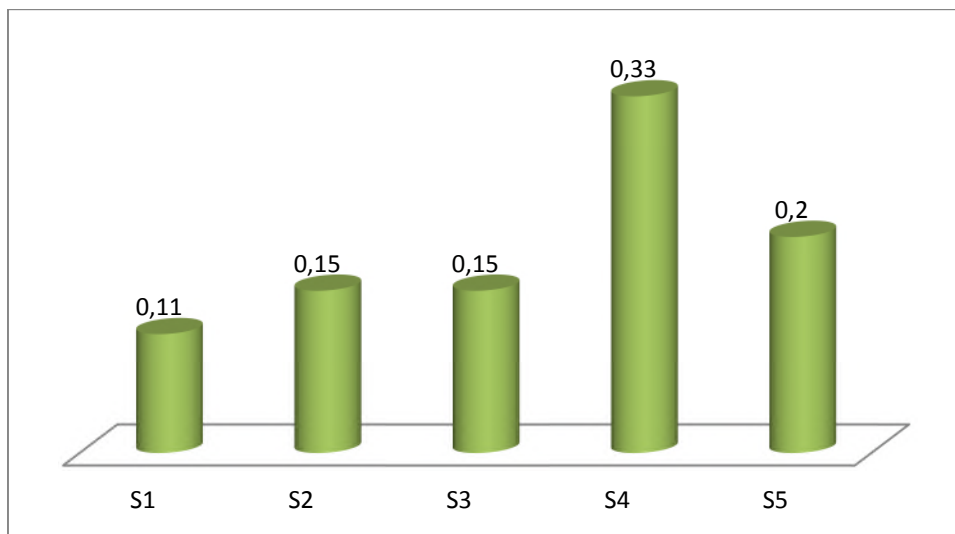
L'analyse statistique classe les échantillons en deux groupes distincts :

Le groupe I est riche en : Sabinène, Terpinène -4-ol et Phénylthyle-isovalérate, ce groupe comprenait des échantillons provenant de la zone littorale près de la mer Méditerranée (Nedroma, Hwanet, Ouled tlata, Bab taza, Bab El assa, Sidi youchaa et Ghazaouet)

- ❖ **Le groupe II** comprenait des échantillons provenant de la zone montagneuse qui ne dépasse pas 900 m d'altitude (Amieur, Agadir et Mansourah). Ces résultats suggèrent que les variations dans les compositions d'huiles essentielles au sein des populations peuvent être attribuées aux conditions de croissance et des facteurs environnementaux. Il faudrait mener une étude génétique pour mettre en évidence la cause exacte de cette variabilité.

V.2. 4 Durée de la conservation de la matière végétale

L'étude a été menée sur la partie aérienne de *Pinus halepensis* récolté en janvier 2012 de la région de Nedroma. Les huiles étaient isolées par hydrodistillation (400 g de plante) pendant 5 h en utilisant un appareil de type Clevenger [4] selon la pharmacopée européenne.



Histogramme 03 : Rendements en huile essentielle en fonction du temps de séchage.

S1 : Matière végétale fraîche, S2 : Séchage Pendant 15 jours, S3 : Séchage pendant 1 mois, S4 : Séchage pendant 2 mois, S5 : Séchage Pendant 4 mois.

Le rendement en H.E. de *P. halepensis* obtenu à l'état frais et son évolution au cours du séchage à l'air libre sont illustrés sur l'histogramme 03 qui montre que le rendement en H.E

augmente au cours du stockage à l'air libre. Il passe de 0,11 à 0,33% au bout de 8 semaines, Au-delà de cette période, on note une diminution du rendement.

Les analyses CPG-IR et CPG-SM des huiles essentielles du *P.halepensis* en fonction du temps du stockage sont représentés dans le tableau **09**.

Tableau 09 : Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. halepensis* en fonction du temps de séchage.

N° Composés ^a	IR _{LIT} ^b	IR _c	S1	S2	S3	S4	S5	Identification
1 α -Thujène	922	923	0,1	0,4	0,3	0,3	0,3	RI-MS
2 α -Pinène	931	932	37,6	14,9	14,6	11	13,3	RI-MS
3 Camphène	943	944	0,5	0,2	0,2	0,1	0,2	RI-MS
4 Sabinène	964	966	tr	2,4	2,4	1,9	1,6	RI-MS
5 β -Pinène	970	971	2,4	1,4	1,2	1,0	1,0	RI-MS
6 Myrcène	970	983	1,3	29,6	33,7	25,0	28,7	RI-MS
7 α -Phelandrène	997	998	-	0,1	-	1,1	1,2	RI-MS
8 3-Carène	1005	1006	0,2	1,9	1,6	0,3	0,2	RI-MS
9 α -Terpinène	1008	1010	tr	0,5	0,21	0,1	0,4	RI-MS
10 m-Cymène	1010	1012	-	0,3	0,3	-	1,0	RI-MS
11 β -Phélandrène	1021	1021	1,1	0,8	0,6	0,5	0,5	RI-MS
12 Limonène	1020	1021	0,8	0,7	0,6	0,4	0,5	RI-MS
13 Z- β -Ocimène	1024	1025	tr	0,1	tr	tr	0,5	RI-MS
14 E- β -ocimène	1034	1036	tr	0,8	0,5	0,5	0,4	RI-MS
15 γ -Terpinène	1047	1049	tr	0,8	0,4	0,5	0,4	RI-MS
16 Terpinolène	1078	1082	0,2	5,2	3,0	3,4	2,6	RI-MS
17 Linalool	1080	1084	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	RI-MS
18 Perillène	1090	1099	-	0,1	0,1	0,1	0,1	RI-MS Ref
19 Cis-p-menth-2-en-1-ol	1108	1107	-	0,1	0,1	-	-	RI-MS
20 Trans-p-menth-2-en-1-ol	1113	1117	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	RI-MS
21 Terpinène-4-ol	1161	1164	0,1	1,9	1,2	0,1	0,3	RI-MS
22 α -Terpinolène	1179	1175	0,4	0,3	0,1	-	tr	RI-MS
23 Acétate de bornyl	1269	1268	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	RI-MS
24 Aceate de citronéllyl	1331	1333	0,1	tr	-	tr	tr	RI-MS
25 Aceéate de néryl	1342	1342	0,1	0,2	-	-	0,2	RI-MS
26 Acétate de géranyl	1361	1360	0,2	0,1	0,1	-	0,1	RI-MS
27 α -Copaène	1379	1373	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	RI-MS
28 Trans-Caryophyllène	1424	1418	9,4	10,6	16,3	16,5	15,8	RI-MS
29 α -Humulène	1456	1449	1,5	2,0	2,8	3,0	1,4	RI-MS
30 2-Phénylethyl isovalérate	1463	1468	0,1	11,6	7,3	8,2	11,0	RI-MS
31 Germacrène D	1480	1474	0,1	0,1	0,3	0,2	tr	RI-MS
32 α -Muuroolène	1496	1492	0,2	tr	0,4	0,4	0,4	RI-MS
33 δ -Cadinène	1516	1513	0,6	0,2	0,2	0,2	0,3	RI-MS
34 E- α -Bisabolène	1532	1532	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	RI-MS
35 Phénylethyl TiglateE	1547	1546	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	RI-MS

36 Phényléthyl Tiglate	Z	1559	1568	0,3	1,5	tr	1,9	0,2	RI-MS Ref
37 Oxide de caryophyllène		1576	1583	0,2	0,5	1,7	0,5	3,0	RI-MS
38 Guaiol		1591	1592	-	0,3	0,3	0,5	0,5	RI-MS
39 Humulène époxyde		1601	1613	0,1	0,2	tr	0,1	0,1	RI-MS
40 Epi-Cubenol		1624	1625	0,1	0,1	-	0,1	0,2	RI-MS
41 Tau-Cadinol		1632	1633	0,1	0,1	-	-	0,1	RI-MS
42 T-Muurolol		1634	1638	0,1	0,1	-	0,3	0,2	RI-MS
43 α -Cadinol		1645	1640	-	0,2	0,1	-	-	RI-MS
44 Bulnésol		1659	1666	-	tr	-	-	-	RI-MS
45 Cembrène		1938	1940	tr	0,6	0,2	0,3	1,1	RI-MS Ref
46 m-Camphorène		1947	1939	-	0,1	0,5	1,3	0,2	RI-MS Ref
47 Cembrène A		1962	1951	tr	0,2	0,2	0,5	0,4	RI-MS Ref
48 p-Camphorène		1980	1974	0,1	tr	0,1	0,4	tr	RI-MS Ref
49 Géranyl Linalool		2037	2037	3,1	3,6	3,7	12,7	3,0	RI-MS Ref
Taux d'identification %				62,2	95,7	96,1	94,2	93,3	
Composés hydrocarbonés (%)				57,2	74,6	81,1	69,4	72,9	
Monoterpènes hydrocarbonés(%)				44.6	60.5	59.8	46.2	52.9	
Ssesquiterpènes hydrocarbonés(%)				12.5	13.2	20.3	20.7	18.3	
Diterpènes hydrocarbonés (%)				0.1	0.9	1.0	2.5	1.7	
Composés oxygénés(%)				5	21,1	15,0	24,8	19,3	
Momnoterpènes oxygénés(%)				0.8	2.7	1.8	0.4	1.0	
Sesquiterpènes oxygénés(%)				0.6	1.5	2.1	1.5	4.1	
Diterpènes oxygénés(%)				3.1	3.6	3.7	12.7	3.0	
Composés oxygénés non-terpéniques (%)				0,5	13,3	7,4	10,2	11,2	

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). ^bRI_{LIT} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005[5,6], ^cRI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1, IR : indices de rétention, S M: spectrométrie de masse en mode impact électronique, Ref: des données de la littérature König et Coll., 2001[5], S1 : matière végétale fraîche, S2 : séchage pendant 15 jours, S3 : séchage pendant 1 mois, S4 : séchage pendant 2 mois, S5 : séchage pendant 4 mois.

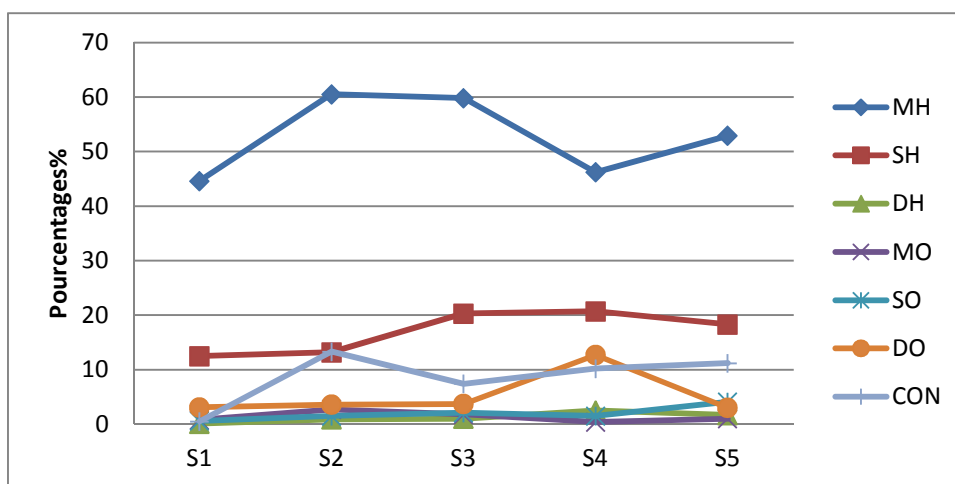


Fig.33 : Variation de la Composition chimique de l'huile essentielle de *P. halepensis* en fonction du temps de séchage.

La figure.33 illustre, les différentes classes de composés caractérisés dans l'huile essentielle de la partie aérienne de *P.halepensis* en fonction du séchage. Nous constatons que la composition chimique des huiles essentielles de *P. halepensis* varie considérablement en fonction du séchage de la plante.

On note, cependant, une légère augmentation des taux de sesquiterpènes hydrocarbonés et une diminution des mono-terpènes hydrocarbonés.

L'analyse révèle aussi une augmentation importante des teneurs en diterpènes oxygénés et en particulier le géranyl linalool dont le taux passe de **3,1 à 12,7 %** après 8 semaines de stockage.

Ce résultat est très important pour une exploitation industrielle : le matériel végétal récolté peut attendre quelques jours, voire quelques semaines avant d'être traité.

V.2.5 Etude comparative

L'étude comparative des compositions chimiques des huiles essentielles de *Pinus halepensis* Mill d'Algérie et de ceux poussant en Italie, Maroc révèle beaucoup de similitudes.

En effet, le Myrcène est le composant majeur dans toutes ces huiles (Algérie : 28.9% ; Italie : 27.9% ; Maroc : 16.3%) [7-10].

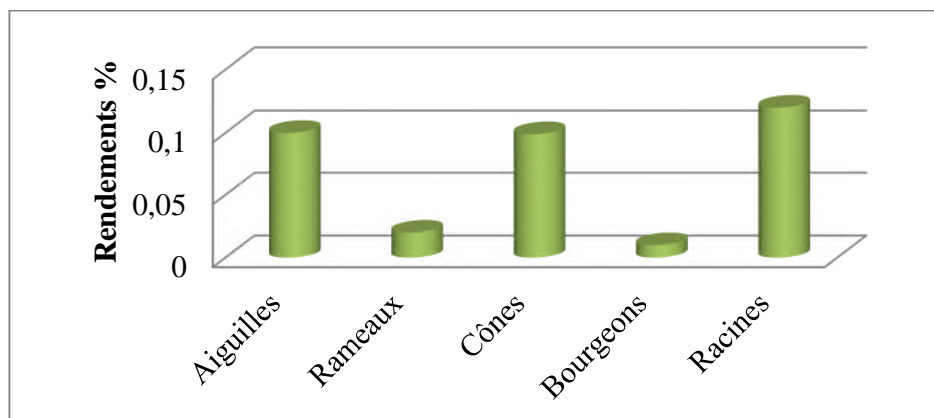
L'huile essentielle de la Turquie et de Grèce ont été largement dominée par α - Pinène et 3-Carène respectivement [11,12]. Il est à noter que des travaux antérieurs, sur l'H.E de *Pinus halepensis* de la région de Ghazaouet (Algérie), réalisés par ABI AYAD et Coll. [13] rapportent que les composés majoritaires sont l'Oxyde de β -caryophyllène (48.15%), Thumbergol (6.66%) et l'Oxyde de humulène (5.78%). Ils concluent, d'après leurs résultats, que c'est une huile riche en Oxyde de β -Caryophyllène, ce qui n'est pas en accord avec nos résultats qui soulignent la richesse de l'H.E en Myrcène.

Cette différence observée peut s'expliquer par une adaptation de la plante aux facteurs abiotiques tels que, le climat spécifique au Moyen Atlas Algérien Oriental, aux facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol qui orientent la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis [2,3, 13].

V.3 Huiles essentielles de *Pinus pinea*

V.3.1 Huiles essentielles des parties de *Pinus pinea*

Les parties aériennes fraîches séparées (aiguilles, rameaux, cônes et les racines) étaient soumises à l'hydrodistillation pendant 5h en utilisant un appareil de type Clevenger selon la Pharmacopée européenne [3]. Les rendements des huiles essentielles sont représentés dans l'**histogramme 04**.



Histogramme 04 : Rendements des huiles essentielles de différentes parties de *P.pinea*.

- D'après l'histogramme **04**, il est intéressant de remarquer que les concentrations en huile essentielles est beaucoup plus importante dans les racines (**1.22%**) et les aiguilles (**0.1%**) que dans les autres parties.
- Les analyses CPG-IR et CPG-SM des huiles essentielles de *P. pinea* obtenues à partir des aiguilles, rameaux, cônes, bourgeons et des racines représentaient respectivement, 87%, 89.8 % ,86.6 % , 89.9 % et 91.3 % d'huiles essentielles, elles ont permis l'identification de 51 composés. Leurs indices de rétention sont présentés dans le Tableau **10**. Parmi les composés identifiés : 23 monoterpènes, 20 sesquiterpènes, quatre composés hydrocarbonés non-terpéniques, trois composés oxygénés non-terpéniques et un diterpène oxygéné. La majorité des composés ont été identifiés en comparant leur spectres de masse et leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque "Arômes". (Voir le **tableau 10**).

Les monoterpènes hydrocarbonés étaient la classe la plus dominante des composés des huiles essentielles du *P.pinea* qui représentait 7.1 à 79.4% pour tous les organes étudiés, le Limonène (17.7 % à 69.3 %) **07** était le principal composant. Son abondance relative était suivie par β -Phelandrène (9.9 % ,4.4 %) **08** dans les aiguilles et les rameaux, Trans- Caryophyllène (29,4 %) **28**, et Oxyde de Caryophyllène (14.8 %) **38** dans les cônes.

Les bourgeons de cette espèce sont caractérisés par : Trans- Caryophyllène (5.1%) **28**, Oxyde de Caryophyllène (17.8%) **38**, Oxyde de Manoylène (32.8%) **47** et Pentacosane (7%) **51**.

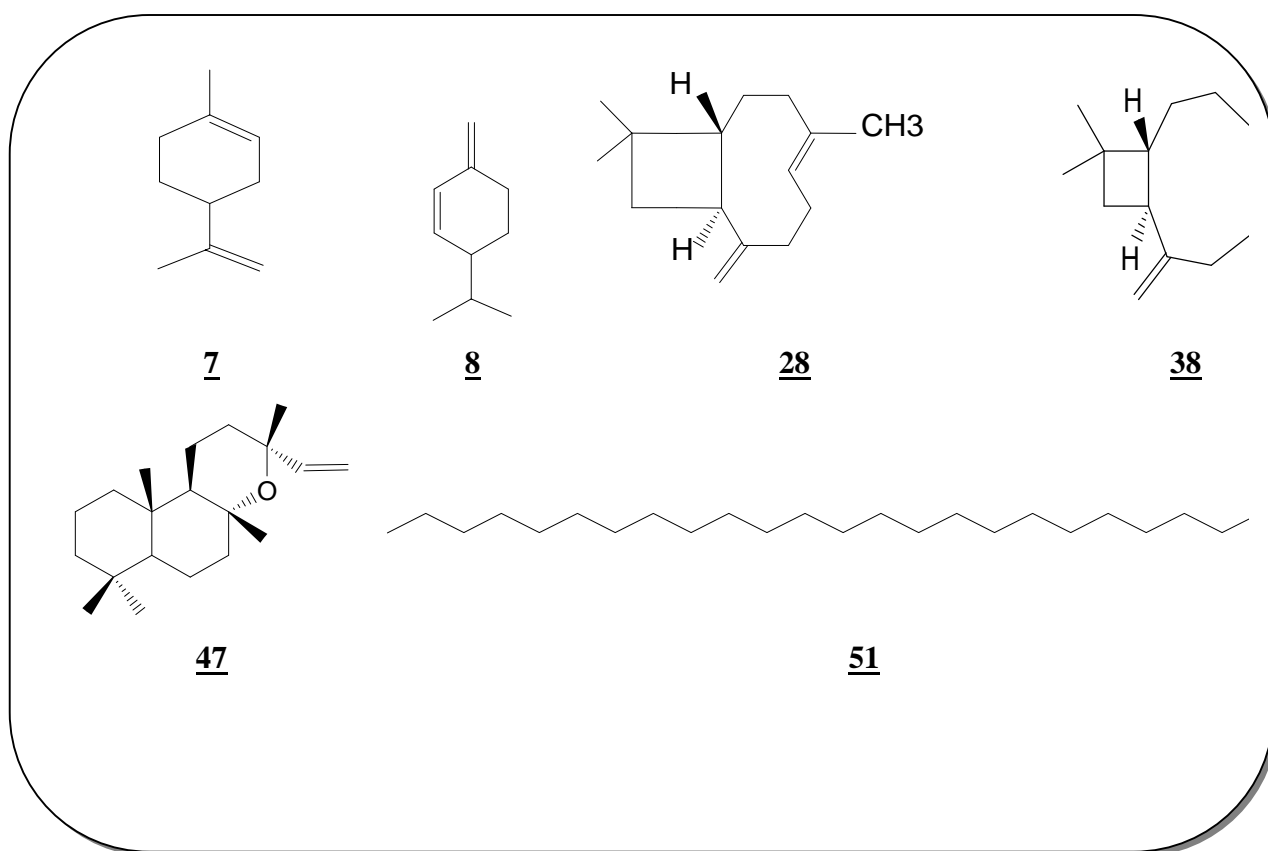


Fig.34: Composés majoritaires identifiés dans différentes parties de *Pinus pinea*.

Des études antérieures ont trouvé des compositions chimiques similaires, pour les huiles essentielles de *P.pinea*. Le limonène a été reporté comme étant le composé majoritaire d'un échantillon d'huile essentielle de la Grèce et de quelques échantillons provenant de la Turquie et la Tunisie [12,15-17].

Le β -Pinène (42.4%) est reporté comme étant le composé majoritaire d'un échantillon de Turquie. Ce composé est aussi reporté à des teneurs appréciables à côté de l' α -pinène dans des échantillons de Maroc [18,10].

Tableau 10: Composition chimique des huiles essentielles de différentes parties de *P. pinea*.

N°	Composés ^a	IR LIT ^b	IR a ^c	IR p ^d	PPF	PPT	PPC	PPB	PPR	Identification
1	α -Pinène	936	932	1022	3,9	3,4	0,7	3,4	2.9	IR-SM
2	Sabinène	973	966	1120	1,9	0,9	0,1	-	-	IR-SM
3	β -Pinène	978	972	1110	2,9	-	0,3	-	0.6	IR-SM
4	Myrcène	987	982	1159	0,5	1,8	0,5	0,7	3.2	IR-SM
5	α -Phéllandrène	1002	998	1164	0,2	0,1	-	-	-	IR-SM
6	α -Terpinène	1013	1010	1178	-	-	0,2	-	-	IR-SM
7	Limonène	1025	1025	1199	53,8	69,3	17,3	2,5	66.3	IR-SM
8	β -Phelandrène	1023	1025	1208	9,9	4,1	0,3	0,5	0.2	IR-SM
9	E- β -Ocimène	1041	1037	1247	0,7	-	-	-	-	IR-SM
10	γ -Terpinène	1047	1049	1243	0,2	-	-	-	-	IR-SM
11	trans-Linaloloxide	1058	1058	1435	-	-	0,1	-	-	IR-SM
12	p-Cymemène	1075	1072	1432	0,6	0,1	tr	-	-	IR-SM
13	Terpinolène	1082	1080	1275	-	-	1	-	-	IR-SM
14	Linalool	1086	1084	1544	0,1	-	0,1	-	-	IR-SM
15	E-Limonene-1,2-époxyde	1130	1124		-	-	0,8	-	-	IR-SM Ref
16	cis-Verbénol	1132	1127	1655	-	-	1,4	-	-	IR-SM
17	Cryptone	1160	1156	1667	0,2	-	0,2	-	-	IR-SM
18	Terpinèn-4-ol	1164	1162	1600	0,7	-	0,2	-	-	IR-SM
19	Myrténal	1172	1170	1628	-	-	0,3	-	-	IR-SM
20	α -Terpinéol	1176	1174	1700	-	-	0,1	-	-	IR-SM
21	Thymyle méthyle oxide	1214	1216	1589	2,2	0,7	1,5	1,0	-	IR-SM
22	2-méthoxyparacymene	1234	1238	1651	-	-	0,1	-	-	IR-SM
23	Péryllaldéhyde	1260	1246	1784	0,2	-	0,6	-	-	IR-SM
24	Acétate de bornyle	1270	1269	1575	-	-	0,1	-	-	IR-SM
25	α -longipinène	1360	1362	1475	0,2	-	0,3	-	0.9	IR-SM
26	α -ylangéne	1376	1371	1476	0,2	-	0,2	-	-	IR-SM
27	longifolène	1411	1404	1571	0,3	1,2	0,8	0,9	2.7	IR-SM
28	trans caryophyllène	1424	1417	1591	2,2	4,5	29,4	5,1	9.6	IR-SM
29	Acétone géranyle	1430	1429	1851	0,2	-	tr	-	-	IR-SM
30	α -Guaiene	1440	1443	1583	0,4	0,7	0,1	-	-	IR-SM
31	α -Humulène	1455	1449	1665	0,5	-	6	1,2	1.5	IR-SM
32	2-phénylméthyle isovalérate	1465	1465	1980	-	0,1	3	1,2	-	IR-SM
33	Germacrène D	1479	1483	1704	0,7	0,1	0,1	1,5	-	IR-SM
34	α -Murolène	1496	1499	1719	0,3	-	0,3	-	-	IR-SM
35	γ -Cadinène	1507	1513	1752	-	0,1	0,1	-	-	IR-SM
36	Trans- α -Bisabolène	1530	1513	1753	-	0,2	0,5	-	-	IR-SM
37	β -Elémol	1541	1533	2072	-	-	tr	-	-	IR-SM
38	Oxide de caryophyllène	1578	1568	1980	0,5	0,3	14,8	18,7	-	IR-SM
39	Globulol	1589	1579	2074	0,3	-	0,1	-	-	IR-SM

40	Guaiol	1593	1584	2090	2	-	0,5	2,6	-	IR-SM
41	Viridiflor	1592	1592	2089	-	-	2,3	-	-	IR-SM
42	Humulène époxyde II	1602	1602	2044	0,5	-	0,1	-	-	IR-SM
43	α -Acorénol	1616	1617	2123	0,3	-	0,6	-	-	IR-SM
44	β -Eudésmol (2E,6E)-Farnésate de méthyle	1641	1651	2232	0,2	-	0,1	0,7	-	IR-SM Ref
45	Acide hénadecanoïque	1765	1762	2200	-	-	-	-	-	IR-SM
46	Oxide de manoyle	1951	1953		-	-	0,3	6,0	-	IR-SM Ref
47	n-Héneicosane	2007	1997	2346	-	0,2	0,7	32,3	-	IR-SM
48	n-Docosane	2100	2099	2100	-	0,1	tr	1,2	-	IR-SM
49	n-Tricosane	2200	2199	2200	0,2	0,7	0,2	2,0	-	IR-SM
50	n-Tricosane	2301	2299	2301	-	1,2	0,2	1,4	-	IR-SM
51	Pentacosane	2498	2499		-	-	-	7,0	-	IR-SM
	Taux d'identification				87,0	89,8	86,6	89,9	91...3	
Composés hydrocarbonés (%)					79,6	88,5	58,6	27,4	88,1	
	Monoterpènes hydrocarbonés (%)				74,6	79,7	20,4	7,1	73,4	
	Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)				4,8	6,8	37,8	8,7	14,7	
	Composés hydrocarbonés non-terpéniques (%)				0,2	2,0	0,4	27,4	-	
Composés oxygénés					7,0	1,3	28	62,5	3,2	
	Monoterpènes oxygénés%				3,4	0,7	5,5	1,0	-	
	Sesquiterpènes oxygénés%				3,8	0,3	18,5	22,0	-	
	Diterpènes oxygénés%				-	0,2	0,7	32,3	-	
	Composés oxygénés non-terpéniques%				0,2	0,1	3,3	7,2	3,2	

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). ^bRILit : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005[5,6], ^cRIa : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention, SM : spectre de masse en mode impact électronique, Ref : des données de la littérature König et Coll., 2001 et des données du NIST[5,6], PPF : les aiguilles de *Pinus pinea*, PPT : les rameaux de *Pinus pinea*, PPC : les cônes de *Pinus pinea*, PPB : les bourgeons de *Pinus pinea*, PPR : les racines de *Pinus pinea*.

V.3.2 Variabilité chimique inter stations des huiles essentielles de *Pinus pinea*

L'analyse par CPG-IR et CPG-SM des huiles essentielles du *P.pinea* obtenus à partir des parties aériennes sur 21 sites comptait pour 80,1 % à 96,4 % des huiles (**Tableau 11**). Au niveau qualitatif, les compositions chimiques des 21 stations présentent de nombreuses similitudes, les pourcentages de leurs composantes principales: α -Pinène C₂ (de 3.4 à 11.2%),

β -Pinène **C₅** (0.8- 3.4%), **C₆** Myrcène (0.1-4%), Limonène **C₁₀** (44.4 à 73.8%), β -Phelandrène **C₁₁** (2.6-11%), α -Terpinéol (0.1-3%) **C₂₃** et trans caryophyllène **C₃₁** (1.7% -8.2%).

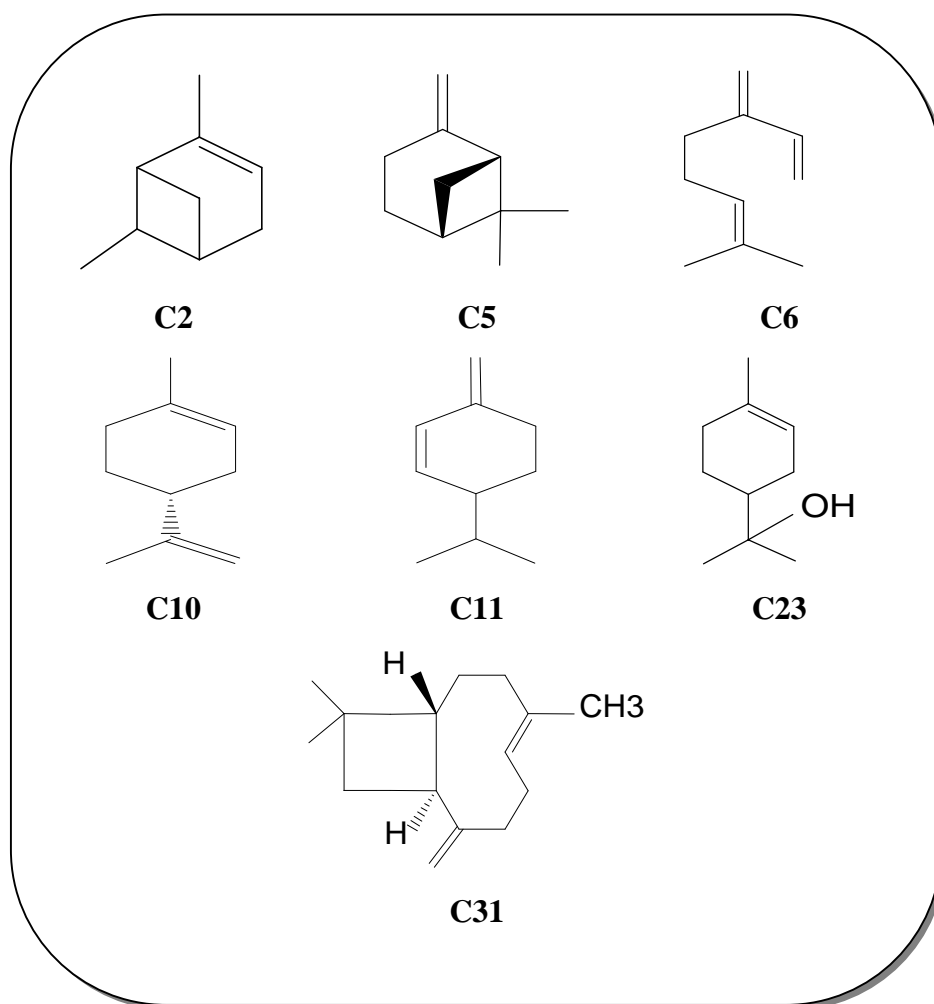


Fig.35 : Composés majoritaires identifiés dans *P.pinea* des différentes régions.

Tableau 11 : Composition chimique des huiles essentielles de *P.pinea* dans diverses localités de l'ouest Algérien.

N°	Composés	RI _{LIT}	IR a	IR p	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	Max	Min	S coll	Identification	
1	Héxanal	832	774	1048	tr	-	0,2	0,1	-	0,6	tr	0,4	2,4	0,1	tr	tr	0,1	tr	-	0,1	0,2	tr	-	-	-	2,4	0,1	0,6	RI-MS	
2	α -Pinène	936	932	1022	4,4	4,5	3,4	7,9	4,3	5,2	6,4	5,2	4,9	9,9	5,2	5,1	11,2	8,9	4,5	9,8	8,7	6,41	4,8	4,73	8,07	11,2	3,4	6,5	RI-MS	
3	Camphène	950	944	1066	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	RI-MS	
4	Sabinène	973	966	1120	0,1	2,1	0,1	tr	1,3	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,2	2	1,1	-	0,1	0,1	0,1	1,2	0,1	2,0	2,1	0,1	0,7	RI-MS	
5	β -Pinène	978	972	1110	2,1	2,5	0,9	1,4	2,3	0,8	1,8	1,4	1,2	2,1	1,2	2,5	3,4	1,8	1,0	1,8	1,6	2,0	2,05	1,41	2,0	3,4	0,8	1,8	RI-MS	
6	Myrcène	987	982	1159	2,7	-	2,5	2,0	-	1,9	4,0	1,4	2,4	3,2	2,4	0,2	tr	0,1	3,0	2,7	3,4	3,5	-	2,5	-	4	0,1	2,3	RI-MS	
7	α -Phéllandrène	1002	998	1164	0,4	0,5	0,2	0,2	0,3	0,1	0,3	0,5	tr	0,4	0,2	0,1	0,3	0,1	-	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,5	0,1	0,3	RI-MS	
8	α -Terpinène	1013	1010	1178	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	tr	-	0,1	tr	0,1	-	0,1	-	0,4	0,1	0,2	RI-MS	
9	p-Cymène	1015	1013	1268	0,3	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,3	0,1	0,1	RI-MS	
10	Limonène	1025	1025	1199	44,4	49,6	61,4	56,7	59,1	57,0	60,1	50,2	52,1	63,6	51,2	58,2	53,3	49,1	65,3	50,2	59	60,1	73,8	51,4	55,9	73,8	44,4	56,5	RI-MS	
11	β -Phélandrène	1023	1025	1208	10,2	11	4,4	4,6	5,7	2,6	8	7,6	5,6	4,2	5,6	4,7	6,4	3,3	4	6,5	5,7	8,5	5	8,6	7,8	11	2,6	6,2	RI-MS	
12	E- β -Ocimène	1041	1037	1247	0,8	1,0	-	0,3	0,3	0,2	0,5	1,6	0,7	0,4	0,7	0,1	0,1	0,3	-	0,6	0,4	0,6	0,2	0,3	0,3	1,6	0,1	0,5	RI-MS	
13	γ -Terpinène	1047	1049	1243	0,1	0,1	0,3	0,1	-	-	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,3	0,1	0,1	RI-MS	
14	Trans-Linaloloxide	1058	1058	1435	0,2	0,2	0,1	-	-	-	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	-	0,1	tr	0,4	-	-	-	0,4	0,1	0,2	RI-MS	
15	p-Cymemène	1075	1072	1432	0,1	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	-	0,6	tr	0,1	-	0,3	0,3	0,2	-	tr	0,2	0,1	0,2	tr	0,3	0,6	0,1	0,3	RI-MS	
16	Terpinolène	1082	1080	1275	0,4	0,5	0,2	0,2	-	-	0,4	0,2	0,3	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,5	0,1	0,2	RI-MS
17	Linalool	1086	1084	1544	1,4	0,3	0,4	-	-	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,2	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	1,4	0,1	0,3	RI-MS	
18	E-Limonène-1,2-epoxyde	1130	1124		0,1	0,1	-	0,2	-	-	tr	-	0,1	tr	tr	-	-	0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	0,2	0,1	0,1	RI-MS Ref	
19	cis-Verbénol	1132	1127	1655	0,1	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0,1	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	0,1	0,1	0,1	RI-MS	
20	Cryptone	1160	1156	1667	0,3	0,1	-	-	-	0,1	-	0,5	0,1	0,2	tr	0,2	0,1	0,1	-	tr	0,1	0,2	0,1	0,3	-	0,5	0,1	0,2	RI-MS	
21	Terpinen-4-ol	1161	1162	1600	0,5	0,4	0,2	0,8	0,3	0,5	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	1,0	-	0,3	-	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	1,0	0,1	0,4	RI-MS	
22	Myrténal	1172	1170	1628	0,1	-	-	-	0,3	-	-	-	-	0,5	-	0,1	0,3	-	-	0,1	-	tr	-	-	-	0,5	0,1	0,25	RI-MS	
23	α -Terpinéol	1176	1174	1700	2,8	3,0	0,8	-	-	0,1	0,3	0,5	0,8	-	0,8	0,1	0,1	0,1	-	0,4	0,3	0,1	-	-	-	3	0,1	0,8	RI-MS	
24	Thymyle méthyle oxide	1214	1216	1589	2,1	1,7	0,9	0,8	1,1	0,9	0,9	1,1	1,3	1,3	1,3	1,1	1,0	0,8	0,9	1,4	1,1	1,2	1,2	2,1	1,6	2,1	0,8	1,2	RI-MS	
25	2-Méthoxy p-cymène	1234	1238	1651	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	-	-	0,1	-	0,1	tr	-	-	0,1	-	0,4	0,1	0,1	RI-MS	

Chapitre V : analyse chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*

26	Péryllaldehyde	1248	1246	1784	1,4	0,1	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	0,4	tr	0,2	0,2	0,1	-	-	1,4	0,1	0,5	RI-MS	
27	Acétate Bornyle	1270	1269	1575	0,5	0,5	0,4	0,2	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,3	0,2	-	-	0,3	-	0,5	0,2	0,3	RI-MS	
28	α Longipinène	1360	1362	1475	0,4	0,1	0,6	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	1,1	0,4	1,1	0,2	0,6	0,5	-	0,4	0,2	tr	0,2	0,2	0,5	0	0	0,4	RI-MS	
29	α -Ylangène	1376	1371	1476	0,1	0,2	0,1	-	-	-	tr	0,3	0,2	0,1	0,1	-	0,2	0,1	-	0,1	tr	tr	-	-	-	0,3	0,1	0,2	RI-MS	
30	Longifolène	1411	1404	1571	1	1,3	1,6	0,9	1,4	0,8	0,9	0,5	2,8	1,1	2,9	0,6	1,5	1,3	1,1	1,0	1,5	0,5	0,6	0,6	1,3	2,9	0,5	1,2	RI-MS	
31	Trans-Caryophyllène	1424	1417	1591	3	3,1	5,4	6,4	5,1	8,2	4,4	3,8	6,5	3,4	6,8	1,7	4,4	4,4	4,3	3,0	5,4	6,9	1,9	4,4	3,4	8,2	1,7	4,6	RI-MS	
32	Géranyl-Acétone	1430	1429	1851	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	-	0,1	0,1	-	0,1	tr	0,1	-	0,1	-	0,2	0,1	0,1	RI-MS	
33	A-Guaiene	1440	1443	1583	0,1	0,2	tr	0,1	0,9	1,5	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,7	tr	0,2	-	0,3	0,1	-	1,5	0,1	0,4	RI-MS	
34	A-Humulène	1455	1449	1665	0,6	0,6	1,1	1,1	-	0,1	0,7	0,6	1,2	0,6	1,2	0,3	0,7	0,9	-	0,5	0,8	0,1	0,1	0,8	0,5	1,2	0,1	0,6	RI-MS	
35	2-Phénylméthyle Isovalérate	1465	1465	1980	2,5	1,1	0,5	0,2	0,4	0,5	0,1	0,8	1,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,9	0,5	0,3	0,1	0,7	-	0,2	-	2,5	0,1	0,6	RI-MS	
36	Germacrène D	1479	1483	1704	0,4	0,8	1,3	0,6	0,8	0,6	0,3	1,1	0,1	0,5	1,2	0,4	0,7	1,2	0,6	0,5	0,5	tr	0,2	0,5	0,6	1,3	0,2	0,7	RI-MS	
37	A-Murolène	1496	1499	1719	0,1	0,4	0,1	0,1	-	0,2	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	-	0,1	0,1	tr	-	0,1	-	0,4	0,1	0,1	RI-MS	
38	Γ -Cadinène	1507	1513	1752	0,1	0,2	0,3	0,1	-	0,2	0,1	0,6	0,2	tr	0,2	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,2	0,1	-	0,1	-	0,6	0,1	0,2	RI-MS	
39	Trans -Bisabolène	1530	1513	1753	tr	0,4	0,2	0,1	-	-	0,2	0,2	-	0,3	0,1	0,4	0,5	1,5	-	0,7	0,7	0,3	-	0,2	-	1,5	0,1	0,5	RI-MS	
40	B-Elémol	1541	1533	2072	0,3	0,1	0,4	0,1	-	1,1	0,1	0,5	0,4	0,1	0,4	0,1	0,1	0,4	-	0,2	0,1	0,1	-	0,2	-	1,1	0,1	0,3	RI-MS	
41	OxideCaryophyllène	1578	1568	1980	0,5	0,6	0,5	1,4	1,4	2,7	0,1	0,3	0,2	0,3	0,4	0,5	0,5	1,0	0,5	0,7	0,3	0,6	0,2	1,3	0,3	2,7	0,1	0,8	RI-MS	
42	Globulol	1589	1579	2074	0,3	-	0,6	0,7	0,8	0,5	0,5	0,3	0,4	0,1	0,9	1,4	0,6	0,2	1,6	0,9	0,2	0,1	0,4	1,3	0,4	1,6	0,1	0,6	RI-MS	
43	Guaiol	1593	1584	2090	1,8	2,7	0,2	0,3	0,2	0,4	0,1	0,7	0,1	0,8	0,2	0,1	0,2	0,4	-	0,4	0,3	0,4	0,1	0,2	-	0,8	0,1	0,3	RI-MS	
44	Viridiflor Humulène Epoxyde II	1592	1592	2089	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	-	0,1	0,2	0,8	0,1	0,2	0,1	0,2	-	-	0,4	0,1	0,1	-	-	-	0,8	0,1	0,3	RI-MS	
45	α -Acorénol	1602	1602	2044	0,5	0,8	0,1	0,2	-	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3	-	0,2	0,1	0,1	-	0,4	-	0,4	0,1	0,2	RI-MS	
46	β -Eudesmol	1616	1617	2123	0,3	0,4	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	-	tr	-	tr	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	RI-MS
47	Benzoate De	1641	1651	2232	0,1	0,6	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,2	0,1	0,1	RI-MS	
48	Benzyle (2E,6E)-Fernesate De	1730	1723		0,1	-	-	-	-	-	0,4	0,5	0,4	0,1	0,1	0,1	tr	tr	-	1,6	1,1	-	-	-	-	1,6	0,1	0,6	RI-MS Ref	
49	Méthyle Acide	1765	1762	2200	0,9	-	-	0,1	-	0,1	0,1	0,2	0,2	-	0,2	0,1	tr	0,1	-	0,1	tr	0,2	-	-	-	0,9	0,1	0,3	RI-MS	
50	Hexadecanoique	1951	1953		0,1	-	tr	0,1	1,4	0,2	0,2	0,5	0,1	tr	0,2	-	0,1	0,3	-	0,1	tr	0,2	-	3,3	-	3,3	0,1	0,7	RI-MS Ref	
51	Oxide de Manoyle	2007	1997	2346	0,1	0,1	0,2	0,9	0,3	2,1	0,2	0,1	1,3	0,1	0,2	0,4	0,7	2,9	-	1,6	0,2	-	1,2	0,1	1,2	2,9	0,1	0,8	RI-MS	
52	n-Heneicosane	2100	2099	2100	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	0,5	0,3	tr	tr	-	-	2,8	-	2,8	0,1	0,5	RI-MS	

Chapitre V : analyse chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*

53	n-Docosane	2200	2199	2200	0,1	0,4	0,2	0,1	0,4	0,2	-	0,6	0,6	-	0,6	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	tr	-	0,6	0,1	0,3	RI-MS
54	n-Tricosane	2301	2299	2301	0,6	0,3	0,2	0,1	-	0,1	-	tr	0,5	-	0,6	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,3	-	0,6	0,1	0,3	RI-MS
55	Pentacosane	2498	2499		0,1	0,4	tr	-	-	-	0,3	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,1	0,4	RI-MS
Taux d'identification %					90.4	94.2	91.5	90.7	89.3	90.9	93.5	86.8	80.1	96.4	88.3	83.1	90.9	85.2	88.9	88.7	94.4	95.2	94.7	91	87.1				
Composés hydrocarbonés(%)					73	80.6	85.7	84.2	82.9	80.5	89.4	77.9	72.3	91.5	82.1	76.7	86.2	76.5	85.0	79.2	89.5	90.1	91.1	80.3	83.3				
Monoterpènes hydrocarbonés(%)					66.3	72.4	74.2	74	73.6	68.1	81.9	69.6	62.4	84.7	67	72.8	77.3	65.2	78	72.7	79.6	82.11	87.8	70.1	77.0				
Sesquiterpènes hydrocarbonés(%)					5.9	7.4	10.9	9.8	8.6	12.0	7.2	7.6	9.3	6.6	13.8	3.9	8.9	10.6	6.7	6.5	9.6	8.0	3.3	7.1	6.3				
composé hydrocarbonés non terpénique(%)					0.8	0.8	0.6	0.4	0.4	0.4	0.3	0.7	0.6	0.2	1.3	-	0.1	0.7	0.3	-	0.3	-	-	3.1	-				
Composés oxygénés					17.4	13.2	5.8	6.5	6.4	10.4	4.1	8.9	6.6	4.9	6.2	6.4	4.6	8.7	3.9	9.5	4.9	5.1	3.6	10.7	3.8				
Monoterpènes oxygénés(%)					9.6	6.5	2.9	2.0	1.7	2.7	1.8	3.5	1.9	2.6	2.8	2.9	1.8	1.9	1.3	2.8	2.4	2.5	1.7	3.5	1.9				
Sesquiterpènes oxygénés(%)					4.1	5.5	2.2	3.1	2.6	4.8	1.3	3.3	2.1	1.8	2.5	2.8	1.8	2.6	2.1	2.9	1.1	1.5	0.7	3.6	0.7				
Composés oxygénés nonterpeniques(%)					3.6	1.1	0.7	0.5	1.8	0.8	0.8	2.0	1.3	0.4	0.7	0.3	0.3	1.3	0.5	2.2	1.2	1.1	-	3.5	-				
Diterpènes oxygénés(%)					0.1	0.1	0.2	0.9	0.3	2.1	0.2	0.1	1.3	0.1	0.2	0.4	0.7	2.9	-	1.6	0.2	-	1.2	0.1	1.2				

^a L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1). ^b Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RI_{LIT}). ^c Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RI_a). ^d indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RI_p). ^e Pourcentage est donné sur la colonne apolaire, tr = trace (<0.05%), les stations: Yaghomrasen (S1), Ain Defla (S2), Chatouane(S3), Bouhannak (S4), Djebala 1(S5), Djebala 2 (S6), Djebala 3 (S7), Bidar(S8), Agadir(S9), Zenata (S10) et Oueled Hasna 1 (S11), Oueled Hasna 2 (S12), Oueled Hasna 3 (S13), Bhira(S14), ,Bhira (S16), ,Bhira (S17), ,Bhira (S18), ,Bhira (S19) ,Bhira (S20) ,Bhira (S21) S coll :huile essentielle collective. Ref : Les Composés identifiées en utilisant la banque de données de König 2001[5].

L'étude minutieuse du **tableau 11** montre que les échantillons de l'ensemble des stations présentent une composition chimique homogène. Pour identifier les relations possibles entre l'abondance des composés organiques volatils et les origines géographiques, une analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse de cluster (CHA; dendrogrammes) ont été appliquées à une matrice reliant les compositions d'huiles essentielles et des sites d'échantillonnage.

Tableau 12: Regroupement des échantillons de *P.pinea* : analyse statistique.

Composés ^a	Groupe I (S1, S2,S12,S13,S19,S21)		Groupe II (S3-S11,S14-S18)	
	Variation ^b	Moyenne ^b	Variation ^b	Moyenne ^b
C2 α -Pinène	4.4-8	2.7	4.3-11.2	7.5
C5 β -Pinène	2-3.4	2.7	0.8-2.3	1.6
C6 Myrcène	0-2.7	2.7	0-3.5	3.5
C10 Limonène	44.4-73.8	59.1	49.1-65.3	57.2
C11 β -Phélandrène	4.7-10.2	7.5	3.3-8.6	5.9
C31 Trans-Caryophyllène	1.7-4.4	6.1	0-8.2	8.8

^a La numérotation se rapporte à ceux du tableau 10; ^b pourcentage des composés (%).

La CHA pour les huiles essentielles des parties aériennes de *P.pinea* permet de distinguer 2 groupes d'échantillons (**Fig.36 et Tableau 12**)

Le premier groupe (I) comprend six échantillons d'huile.

Le second groupe (II) contient aussi treize échantillons.

Dendrogram of agnes(x = pinea, metric = "euclidean", stand = T, method = "wai

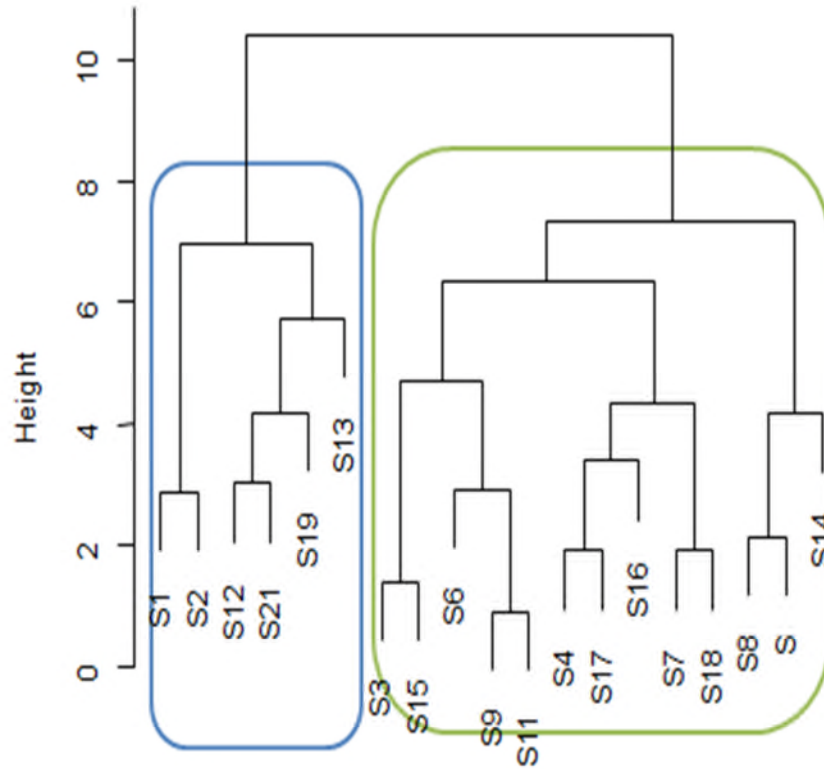


Fig.36 : CHA des compositions chimiques de *P. pinea* de l'ouest Algérien.

L'ACP (**Fig.37**) confirme les résultats de la CHA et met en évidence les principales différences d'ordre quantitatif entre les 2 groupes de composition chimique.

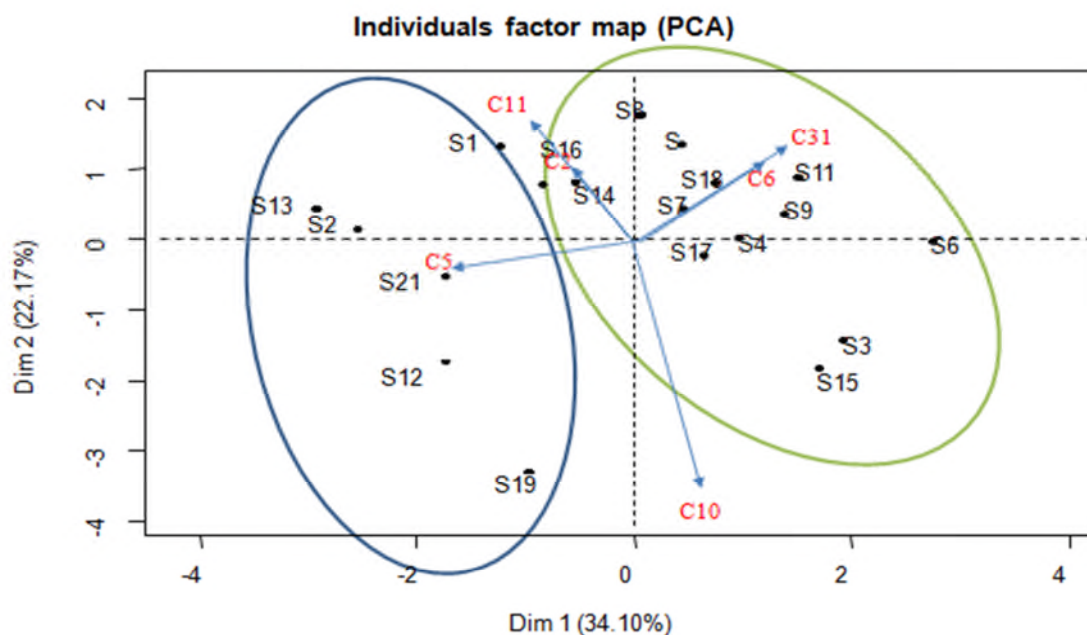
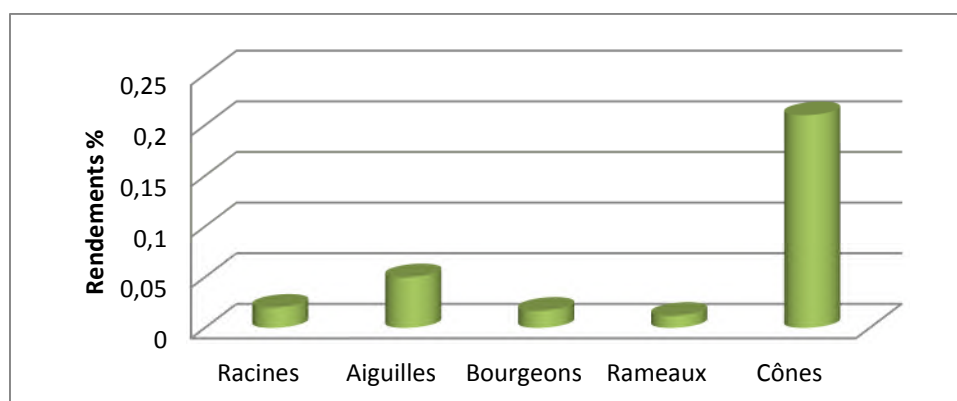


Fig.37 : ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *P. pinea*

V.4 Huile essentielle de *Pinus pinaster*

V. 4 1 Huiles essentielles de différentes parties de *Pinus pinaster*

Nous avons étudié l'effet de l'organe de *P. pinaster* (racines, aiguilles, rameaux) sur le rendement et la composition de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation. Les rendements de l'huile sont : 0,02 % pour les racines et de 0,012 à 0,21% pour les parties aériennes de l'huile (les résultats sont représentés dans l'histogramme 5).



Histogramme 05 : Rendements des huiles essentielles de différentes parties de *P. pinaster*.

Les analyses CPG-IR et CPG-SM des huiles essentielles du *P. pinaster* obtenues à partir des aiguilles, des rameaux, des cornes, des bourgeons et des racines, nous ont permis d'identifier 71 composés.

Parmi les composés identifiés : 29 mono-terpènes, 19 sesquiterpènes, 2 composés hydrocarbonés non-terpéniques, 16 composés oxygénés non-terpéniques, et 5 diterpènes. La majorité des composés a été identifiée par la comparaison des indices de rétention et des spectres de masse expérimentaux avec ceux de composés de référence présents dans la bibliothèque « Arômes » propre au laboratoire de l'université de Corse.

- ❖ Parmi toutes les molécules identifiées dans les aiguilles de *P. pinaster*, α -Pinène **6** (27.2%), β -Pinène **10** (10,6%), Myrcène **11** (6,9%), 3-Carène **13** (5,6%), E- β -Caryophyllène (7.2%) et Abeita-6,13-diène **70** (7%) sont les composés majoritaires.
- ❖ L'huile essentielle des rameaux est majoritairement caractérisée par : α -Pinène **6** (63.52%), β -Pinène **10** (5.5%) et E- β -Caryophyllène (12.4%).
- ❖ Les composés majoritaires dans l'huile essentielle des cônes sont : α -Pinène **6** (46.5%), β -Pinène **10** (7.7%), Longifolène **45** (14.5%) et E- β -Caryophyllène (8.5%).
- ❖ Nous constatons aussi que les bourgeons sont riches en : α -Pinène **6** (67.4%) et β -Pinène **10** (5.2%).
- ❖ L'huile essentielle des racines de *Pinus pinaster* est caractérisée par : β -Pinène (27,1%), α -Pinène **6** (22%), et Trans-*p*-Caryophyllène (21,4%).

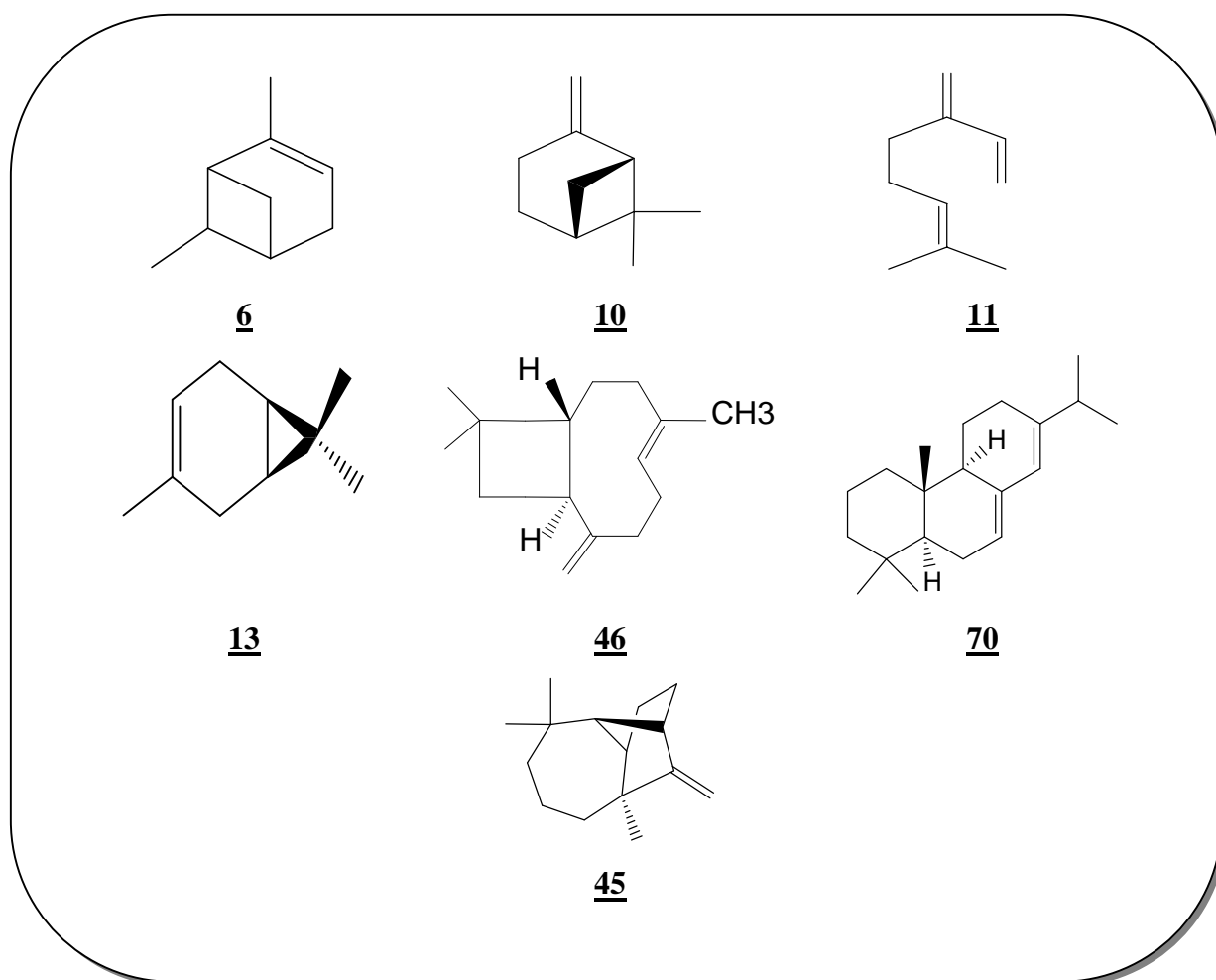


Fig.38 : Composés majoritaires identifiés dans *Pinus pinaster*.

Tableau 13 : Composition chimique des huiles essentielles de différentes parties de *P. pinaster*

N°	Composés ^a	IR _{LITb}	IR _a ^c	IR _p ^d	PMA	PMT	PMC	PMB	PMR	Identification
1	Héxanal	774	774	1048	tr	0,7	0,1	0,1	-	IR-SM
2	Héptanal	877	876	1187	tr	-	-	-	-	IR-SM
3	Tricyclène	914	920	1020	tr	0,1	-	0,2	-	IR-SM
4	α -Thujène	917	922	1023	-	0,1	0,1	-	-	IR-SM
5	α-Pinène	931	928	1022	27,2	63,5	46,5	67,4	22.0	IR-SM
6	Camphène	940	943	1066	0,2	1,1	0,7	1,5	1.1	IR-SM
7	Thuja-2,4(10) diène	942	946	1123	tr	-	0,2	0,3	-	IR-SM
8	Sabinène	960	964	1120	0,2	-	0,2	0,1	-	IR-SM
9	β-Pinène	966	970	1110	10,6	5,5	7,7	5,2	27.1	IR-SM
10	Myrcène	976	976	1159	6,9	2,4	2,2	1,9	1.1	IR-SM
11	α -Phéllandréne	989	997	1164	tr	-	0,2	tr	-	IR-SM
12	3-Carène	1002	1005	1147	5,6	2,7	3,3	tr	-	IR-SM
13	p-Cymène	1006	1011	1268	0,1	-	0,2	0,1	-	IR-SM
14	Limonène	1015	1020	1199	2,2	1,8	1,3	2,2	1.6	IR-SM
15	β -Phéllandréne	1015	1021	1208	0,1	0,8	0,4	0,6	0.3	IR-SM
16	z- β -Ocimène	1019			tr	-	-	-	-	IR-SM
17	γ -Terpinène	1042	1047	1243	0,1	-	0,1	tr	-	IR-SM
18	p-Cymenène	1069	1070		0,1	0,3	0,1	0,1	-	IR-SM
19	Terpinolène	1072	1078	1280	1	0,1	0,1	0,8	-	IR-SM
20	Nonalal	1076	1083	1394	1,1	0,1	0,4	-	-	IR-SM
21	Linalool	1079	1081	1544	0,1	-	-	0,2	-	IR-SM
22	α -Canpholénal	1098			0,2	-	0,1	0,6	-	IR-SM
23	Camphre	1117	1123	1517	-	-	0,2	0,7	-	IR-SM
24	Cis- verbénol	1124	1127	1655	-	-	0,1	0,2	-	IR-SM
25	Pinocarvone	1133	1136	1558	0,2	-	0,1	0,5	-	IR-SM
26	Lyratol	1140	1150	1780	0,1	-	0,1	0,1	-	IR-SM
27	Terpinèn-4-ol	1154	1161	1600	0,1	-	0,1	0,6	-	IR-SM
28	p-Cymèn-8-ol	1154	1161	1833	0,1	-	0,1	0,1	-	IR-SM
29	Myrténal	1164	1172	1628	1,3	-	0,1	1,3	-	IR-SM
30	α -Terpinéol	1176	1700	1700	tr	-	0,2	0,5	-	IR-SM
31	Verbénone	1176	1184	1707	-	-	0,2	0,2	-	IR-SM
32	Décanal	1180	1185	1498	-	-	-	-	-	IR-SM
33	Thymyle méthyle oxyde Cis-3-héxényl-2-méthyle	1210	1214	1589	0,1	-	0,1	0,1	-	IR-SM
34	butyrate	1213	1220	1457	0,4	-	-	0,1	-	IR-SM
35	Héxyle isovalérate	1217	1220	1442	0,1	-	0,1	0,1	-	IR-SM
36	2- Décanal	1232	1248	1652	0,6	-	-	0,1	-	IR-SM
37	Acétate de bornyl	1264	1269	1575	0,1	0,5	0,2	0,6	1.7	IR-SM
38	Tridécanal	1285			-	-	-	0,2	-	IR-SM
39	Pinan-2,3diol	1317	1308	2154	-	-	-	-	-	IR-SM
40	Acétate de néryl	1357	1361	1752	0,3	-	1,6	2,0	-	IR-SM

41	α -Cubébène	1344	1350	1452	0,1	-	0,1	tr	-	IR-SM
42	Acétate de géranyl	1357	1361	1752	0,7	0,2	0,1	0,1	-	IR-SM
43	α -Copaène	1371	1379	1488	0,1	0,4	0,6	0,3	0,9	IR-SM
44	Dodécanal	1382	1389	1708	-	-	0,7	0,1	-	IR-SM
45	Longifolène	1400	1413	1571	0,1	0,9	14,5	1,1	-	IR-SM
46	E- β -Caryophyllène	1414	1424	1591	7,2	12,4	8,5	0,9	21.4	IR-SM
47	α -Humulène	1446	1456	1665	1,4	1,9	0,1	0,1	3.2	IR-SM
48	2-Phényléthyle-isovalérate	1463	1465	1980	3,3	0,2	1,3	0,1	-	IR-SM
49	γ -Muuroloène	1468	1471	1681	0,1	0,1	0,1	0,1	-	IR-SM
50	Germacrène D	1473	1480	1704	1,2	0,1	0,1	0,1	-	IR-SM
51	α -Muuroloène	1490	1496	1719	0,1	0,2	0,3	0,1	3.2	IR-SM
52	γ -cadinène	1503	1507	1752	tr	1,0	0,1	0,2	-	IR-SM
53	Trans-Calaménène	1507	1512	1816	-	0,2	0,9	0,2	-	IR-SM
54	δ -cadinène	1512	1516	1752	0,6	-	0,7	0,2	-	IR-SM
55	E- α -bisabolène	1531	1532	1753	tr	--	-	-	-	IR-SM
56	E-nerolidol	1542	1546	2037	0,3	-	-	tr	-	IR-SM
57	Phényl éthyle tiglate	1544	1553	2148	0,7	-	-	-	-	IR-SM
58	Acide dodécanoïque	1544	1556		-	-	-	-	-	IR-SM Ref
59	Oxyde caryophyllène	1566	1576	1980	0,9	1,5	0,4	0,5	-	IR-SM
60	Gaaiol	1582	1591	2090	0,1	0,3	0,1	0,1	-	IR-SM
61	Géranyl-2-méthyl butyrate	1586	1591		0,2	-	0,1	0,1	-	IR-SM
62	Humulène époxyde II	1591	1601	2044	-	-	-	0,1	-	IR-SM
63	1,10-diepi-cubénol	1613	1608	2031	0,3	-	0,2	0,2	-	IR-SM
64	cadin-4-èn-7-ol cubénol	1624	1627	2096	0,4	-	0,1	0,1	-	IR-SM
65	E-z Acetate de farnésyl 6, 10,14-Triméthyl 2-	1816	1793	2123	0,1	-	0,1	0,3	-	IR-SM
66	pentadécane	1828	1817		0,1	-	-	-	-	IR-SM Ref
67	Isopimara-3,15-diène	2004	2010		3,3	0,2	0,2	0,1	-	IR-SM Rel
68	Abeita-8,12-diène	2010	2046		4,3	-	0,1	0,1	-	IR-SM Ref
69	Abeita tri -diène	2034	2046		3,0	0,1	0,1	0,4	-	IR-SM Ref
70	Abeita-6,13- diène	2084	2072		7	-	0,1	0,2	-	IR-SM Ref
71	Abeita-8(14) ,13(15)- diène	2133	2152		2,0	0,2	0,1	tr	-	IR-SM Ref
Taux d'identification%					96,7	99,6	96,8	94,5		
Composés										
hydrocarbonés(%)					84,9	96,1	89,9	84,7	83,6	
Monoterpènes hydrocarbonés(%)					54,3	78,4	63,3	80,4	53.2	
sesquiterpènes hydrocarbonés(%)					10,9	17,2	26	3,3	28.7	
Composés hydrocarbonés non- terpéniques(%)					0,1	-	-	0,2	-	
Diterpènes hydrocarbonés(%)					19,6	0,5	0,6	0,8	-	
Composés oxygénés(%)					11,8	3,5	6,9	9,8	1,7	
Monoterpènes oxygénés(%)					1,4	0,7	1,4	3,8	1,7	
Sesquiterpènes oxygénés(%)					2,2	1,8	0,9	1,1	-	
Composés oxygénés-non terpénique(%)					8,2	1,0	4,6	4,9	-	

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1), ^bRI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005 [5,6], ^cRI_a : indices de

réretention sur colonne apolaire Rtx-1, IR : indices de réretention, SM : spectrométrie de masse en mode impact électronique, des données, tr : trace (<0.05%), PMA : les aiguilles de *Pinus pinaster*, PMT : les rameaux de *Pinus pinaster*, PMC : les cônes de *Pinus pinaster*, PMR : les racines de *Pinus pinaster*, Ref : Les Composés identifiées de la banque de la littérature [5].

V.4. 2 Etude de la variabilité chimique

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique de l'huile essentielle de *P.pinaster* d'Algérie, nous avons analysé 18 échantillons d'huile essentielle obtenus par hydrodistillation des parties aériennes de *P.pinaster*. Le matériel végétal a été récolté durant les mois de Mars et Avril 2012.

Les huiles essentielles sont analysées par CPG-IR et CPG/SM-IE. Ces analyses ont permis d'identifier 70 composés représentent 87.1% à 99.5% de la composition chimique des huiles essentielles. Leurs indices de réretention et les pourcentages des abondances normalisées sont présentés dans le **Tableau 14**. Les identifications ont été établies sur la base des bibliothèques « Arômes » propres au laboratoire de Corse. Les échantillons d'huile essentielle ont une composition assez proche, caractérisée par une teneur importante en monoterpènes hydrocarbonés (environ 70%) avec α -Pinène (18-72.8%) et β -Pinène (0-33.6%) comme constituants majoritaires. Le Myrcène (0-13.4%), le Limonène (0.1-7.8%) sont les deux composés présents à des teneurs appréciables. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont principalement représentés par l'E- β -Caryophyllène (0.3-25.1%). Les composés oxygénés non-terpéniques sont aussi présent à savoir 2-Phényléthyle-isovalérate (0.4-10.1%).

Tableau 14 : Composition chimique des huiles essentielles de *P.pinaster* dans diverses localités de l'ouest Algérien.

N°	Composés ^a	IR _{LIT} ^b	IR ^{a,c}	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	Max	Min	L	Identification
1	Héxanal	774	774	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0,1	0,1	0,1	RI-MS
2	Héptanal	877	876	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	RI-MS
3	tricyclène	914	920	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	RI-MS
4	α -Thujène	917	922	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1	-	0,1	tr	-	-	0,1	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	RI-MS
5	α - Pinène	931	928	39,5	72,7	36,4	37,6	51,9	32,9	41,6	57,2	18,8	18	24,3	-	20,6	27,4	23,5	35,2	40,1	40,7	72,7	18	36,4	RI-MS
6	Camphène	940	943	1,28	1,5	0,5	1,5	1,3	1,1	0,8	1,7	0,4	0,2	0,5	-	0,3	0,8	0,6	0,4	0,9	0,9	1,7	-	0,9	RI-MS
7	Thuja-2,4(10)diène	942	946	0,3	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,2	-	0,1	tr	-	-	-	-	tr	0,1	-	0,3	-	0,1	RI-MS
8	Sabinène	960	964	0,3	0,1	0,2	tr	0,1	0,2	tr	tr	-	0,1	tr	-	-	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,3	-	-	RI-MS
9	β -Pinène	966	970	3,1	4,0	15,6	5,2	5,2	2,8	3,4	5,2	1,7	3,7	2	-	26,1	33,6	28,7	29,2	19,6	20,2	33,6	-	12,3	RI-MS
10	Myrcène	976	976	6,7	1,7	10,7	13,4	2,2	8,5	1,3	1,9	3,5	8,5	1,2	-	1,2	6,5	8,7	4,7	1,1	1	13,4	-	4,9	RI-MS
11	α -Phéllandrène	989	997	0,2	-	tr	0,1	0,1	0,1	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	tr	tr	0,2	-	0,1	RI-MS
12	3-Carène	1002	1005	14,3	2,3	15,0	0,4	tr	13,2	-	0,1	7,1	8,9	10,5	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	15	-	5,8	RI-MS
13	p-Cymène	1006	1011	0,3	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	0,3	-	0,1	RI-MS
14	Limonène	1015	1020	0,1	2,1	1,3	1,6	1,8	1,1	1,24	2,3	4,3	3,3	6,5	-	7,8	1,6	1,6	1,3	1,9	1,5	7,8	0,1	2,4	RI-MS
15	β -Phéllandrène	1015	1021	1,1	0,6	1,1	2,1	1,7	0,8	1,2	1,7	0,8	0,7	0,8	-	1,2	1,5	1,2	1	0,9	0,8	2,1	-	1,1	RI-MS
16	z- β -Ocimène	1019		tr	--	tr	0,1	0,1	-	-	tr	-	tr	-	-	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	-	0,1	RI-MS
17	γ -Terpinène	1042	1047	0,2	0,1	-	0,1	0,1	0,2	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	-	-	-	0,1	-	0,1	0,1	0,2	-	0,1	RI-MS
18	p-Cymenène	1069	1070	0,1	1,3	0,1	tr	tr	tr	-	0,1	-	0,1	-	-	-	-	0,8	0,2	tr	tr	1,3	-	0,5	RI-MS
19	Terpinolène	1072	1078	0,9	-	0,1	tr	1,2	1,4	0,1	0,7	0,9	0,9	tr	-	0,7	-	1,7	0,9	0,7	0,3	1,7	-	0,1	RI-MS
20	Nonalal	1076	1083	0,2	-	1,3	1,5	2,1	0,2	-	0,7	0,2	0,4	1,3	-	0,2	0,4	-	0,1	0,4	-	2,1	-	0,7	RI-MS
21	Linalool	1079	1081	tr	0,1	0,9	1,8	-	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	-	1,4	-	-	0,3	0,5	1,8	-	0,5	RI-MS
22	α -Canpholénal	1098		0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3	0,1	0,4	-	0,2	RI-MS
23	Camphre	1117	1123	0,7	tr	Tr	0;1	0,1	0,2	0,2	0,4	-	0,1	0,1	-	0,1	0,2	0,1	0,2	0,6	0,3	0,6	-	0,3	RI-MS
24	Cis - Verbénol	1124	1127	0,2	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	-	0,1	RI-MS
25	Pinocarvone	1133	1136	0,5	-	Tr	-	tr	0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,2	-	0,3	0,2	tr	0,3	-	0,2	RI-MS
26	Lyratol	1140	1150	0,5	-	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	-	tr	0,1	-	-	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,3	-	0,2	RI-MS
27	Terpinen-4-Ol	1154	1161	0,1	0,1	Tr	0,1	0,1	tr	0,1	0,3	0,2	0,5	0,3	-	0,3	tr	0,1	0,2	0,2	0,1	0,5	-	0,2	RI-MS

Chapitre V: Analyse chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*

28	P-Cymen-8-Ol	1154	1161	0,1	tr	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	-	0,1	-	-	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	-	0,3	-	0,2	RI-MS	
29	Myrténal	1164	1172	0,2	0,1	0,1	1,3	0,1	0,8	1,2	0,2	0,9	3,1	0,1	-	7,5	4,5	4,9	3,1	4	1,8	7,5	-	2,0	RI-MS	
30	A-Terpinéol	1176	1700	0,7	0,2	1,3	tr	2,9	0,1	0,1	2,1	-	0,1	1,0	9,1	-	-	-	0,1	0,1	tr	2,1	-	0,8	RI-MS	
31	Verbénone	1176	1184	0,6	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	tr	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,6	-	0,2	RI-MS
32	Décanal	1180	1185	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	RI-MS
33	Thymyle Methylé Oxyde	1210	1214	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	-	0,1	-	0,2	-	0,1	RI-MS	
34	Cis-3-Héxényl-2- méthylebutyrate	1213	1220	0,1	-	tr	tr	tr	0,1	tr	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	5	RI-MS	
35	Héxyle Isovalérate	1217	1220	tr	tr	tr	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,1	-	0,1	RI-MS	
36	2- Décanal	1232	1248	0,1	-	0,2	0,4	0,5	0,1	-	tr	-	tr	tr	-	-	0,6	0,6	0,1	-	0,3	0,6	-	0,3	RI-MS	
37	Acétate de Bornyl	1264	1269	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,5	0,2	0,2	0,1	0,1	-	0,2	0,5	0,5	-	0,5	0,3	0,5	-	0,3	RI-MS	
38	Tridécane	1285		tr	0,1	0,1	0,1	-	-	-	0,1	0,3	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,2	0,1	0,1	0,3	-	0,1	RI-MS	
39	pinan-2,3diol	1317	1308	0,1	-	tr	tr	-	-	-	tr	-	0,2	tr	-	-	0,1	-	0,1	-	-	0,2	-	0,1	RI-MS	
40	Acétate Néryl	1357	1361	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	-	0,1	0,5	0,5	0,1	-	0,4	0,3	0,4	0,2	0,4	0,4	0,5	-	0,3	RI-MS	
41	α -Cubébène	1344	1350	0,2	0,1	-	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	-	0,1	0,4	-	-	0,1	0,4	0,2	-	0,3	0,4	-	0,2	RI-MS	
42	Acétate de géranyl	1357	1361	0,4	0,3	-	0,6	0,4	0,2	0,8	0,2	0,1	0,1	0,4	-	-	-	-	0,3	-	-	0,8	-	0,3	RI-MS	
43	α -Copaène	1371	1379	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5	0,3	0,4	0,5	0,2	0,9	-	0,2	3,8	-	0,5	0,3	0,4	3,8	-	0,6	RI-MS	
44	Dodécanal	1382	1389	0,1	-	0,3	0,2	0,4	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	tr	0,1	0,4	-	0,2	RI-MS	
45	Longifolène	1400	1413	0,3	0,6	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	0,4	2,1	0,6	0,9	-	1,1	-	-	-	2,2	3,4	3,4	-	1	RI-MS	
46	E- β -Caryophylène	1414	1424	3,4	2,0	2,3	7,5	0,4	6,6	15	7,6	4,1	6,2	7,1	25,1	13	3,8	4,2	3,1	0,3	5,2	25,1	0,3	6,5	RI-MS	
47	α -Humulène 2-Phényléthyle-	1446	1456	0,7	0,1	0,4	1,1	0,4	1,1	2,4	1,2	0,1	0,1	1,2	30,7	1,9	tr	2,0	0,1	0,3	0,8	30,7	tr	2,6	RI-MS	
48	isovalérate	1463	1465	2,3	0,9	0,6	1	0,4	1,8	1,2	2,7	2,2	3,5	1,8	4,6	1,9	7,7	10,1	8,2	6,1	1,1	10,1	0,4	3,2	RI-MS	
49	γ -Muuroolène	1468	1471	0,3	0,2	2,4	3,3	0,4	0,3	3	0,1	9,7	18,8	6,1	-	7,4	0,1	0,2	0,7	0,2	4,3	18,8	-	3,4	RI-MS	
50	Germacrène D	1473	1480	3,2	0,1	0,2	2,2	0,4	4,7	1,1	0,3	0,9	1,6	2,8	-	0,6	0,1	0,2	1,2	1,4	0,4	4,7	-	1,3	RI-MS	
51	α -Muuroolène	1490	1496	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	-	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,4	-	0,2	RI-MS	
52	γ -Cadinène	1503	1507	0,4	0,1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,2	0,1	0,3	1,2	0,5	5	0,2	0,4	0,4	0,6	0,1	0,2	5	0,1	0,6	RI-MS	
53	Trans-Calaménène	1507	1512	0,1	0,3	0,1	0,7	0,4	1,2	0,6	0,1	1,1	1,9	0,2	-	0,1	0,2	0,4	0,3	0,1	0,5	1,9	-	0,5	RI-MS	
54	δ -Cdainène	1512	1516	0,9	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	0,1	0,6	-	0,1	1,6	-	0,4	0,2	0,6	1	0,6	0,1	1,6	-	0,5	RI-MS	
55	E- α -Bisabolène	1531	1532	0,4	0,1	-	0,3	0,4	tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,4	-	0,2	RI-MS	
56	E-Nérolidol	1542	1546	tr	0,1	0,1	tr	0,4	0,2	0,1	0,2	0,4	0,7	0,2	-	0,4	0,1	-	0,2	0,1	0,1	0,7	-	0,2	RI-MS	

Chapitre V: Analyse chimique des huiles essentielles du genre *Pinus*

57	Phényl éthyle tiglate	1544	1553	0,1	0,1	-	0,1	0,4	0,3	0,3	0,1	0,4	0,3	-	-	0,1	0,1	-	0,2	0,1	0,1	0,3	-	0,2	RI-MS
58	Acide dodécanoïque	1544	1556	0,1	-	-	tr	0,4	0,6	-	-	2,1	-	0,2	-	0,1	0,2	0,3	-	-	-	2,1	-	0,5	RI-MS
59	Oxyde de Caryophyllène	1566	1576	0,5	-	0,3	0,3	0,4	0,3	1,3	0,7	0,2	1,0	0,2	14,8	0,9	tr	-	0,5	0,1	0,5	1,3	-	0,5	RI-MS
60	Guaiol	1582	1591	0,1	0,2	tr	0,5	0,4	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	-	0,2	-	-	0,2	-	0,1	0,5	-	0,2	RI-MS
61	Géranyl-2-méthylbutyrate	1586	1591	0,1	0,1	tr	0,1	0,4	tr	0,2	tr	0,1	0,2	-	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1	0,4	-	0,1	RI-MS
62	Humulène époxyde II	1591	1601	0,1	tr	tr	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	-	-	0,1	-	-	-	-	0,1	0,4	-	0,2	RI-MS
63	1,10-diepi-Cubénol	1613	1608	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,1	-	0,2	0,3	0,8	0,5	-	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,8	-	0,2	RI-MS
64	Cadin-4-en-7-Olcubénol	1624	1627	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,7	0,1	10,8	tr	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	10,8	-	0,8	RI-MS
65	E-Acétate de farnésyl	1816	1793	tr	0,1	0,1	0,2	0,4	tr	0,2	tr	-	0,2	0,5	-	0,2	-	0,2	-	0,1	0,1	0,5	tr	0,2	RI-MS Ref
66	6, 10,14-Triméthyl 2-pentadécane	1828	1817	tr	tr	0,1	-	0,4	0,1	-	-	-	0,6	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	0,3	RI-MS
67	Isopimara-3,15-diène	2004	2010	1,0	0,6	0,7	2,1	0,4	1,7	3	0,5	6,5	0,8	1,3	-	0,4	0,3	0,3	0,4	0,8	1,8	6,5	-	1,3	RI-MS Ref
68	Abeita-8,12-diène	2010	2046	2,7	0,5	0,4	2,3	0,4	3,2	2,8	0,4	3	0,1	3,4	-	0,1	-	0,1	-	0,7	0,1	3,4	-	1,3	RI-MS Ref
69	Abeitatridiène	2034	2046	1,2	1	1,2	1,8	0,4	2,6	5,5	1,5	3,5	0,1	2,4	-	0,1	-	0,2	-	1,3	4,7	5,5	-	1,8	RI-MS Ref
70	Abeita-6,13-diène	2084	2072	2,5	1,1	1,5	0,8	0,4	tr	3,7	1,8	17,3	0,3	4,9	-	0,4	0,5	1,8	0,6	0,1	0,1	17,3	-	2,4	RI-MS Ref
71	Abeita-8(14),13(15)-diène	2133	2152	0,5	0,1	0,2	0,4	0,4	0,7	0,6	0,2	2,1	0,1	2,3	-	0,2	0,1	0,2	0,2	0,6	0,3	2,3	-	0,5	RI-MS Ref
	Taux d'identification			96,18	97,6	98,5	95,8	87,1	93,3	97,0	96,9	98,3	92,2	91,0	91,0	97,8	99,5	97,0	97,6	89,5	95,5	99,5	87,1	86,2	
	Composés hydrocarbonés(%)			86,7	94,2	92,1	86,2	74,6	86,9	89,1	87,1	89,3	78,3	83,3	60,8	82,5	81,7	78,5	82,5	74,9	81,7				
	Monoterpènes hydrocarbonés(%)			68,6	86,8	81,4	62,5	66	62,7	49,8	71,5	37,7	44,9	46,1	-	58,2	71,9	67,2	73,1	65,8	65,8				
	Sesquiterpènes hydrocarbonés(%)s			10,2	4,0	6,5	16,2	4,6	15,6	23,6	11,2	19,1	31,4	22,2	60,8	25	8,9	8,6	8,1	5,6	15,8				
	Diterpènes hydrocarbonés (%)			7,9	3,3	4,0	7,4	2,0	8,2	15,6	4,4	32,4	1,4	14,3	-	1,2	0,9	2,6	1,2	3,5	7,0				
	Composés hydrocarbonés non-terpénique(%)			-	0,1	0,2	0,1	2	0,4	0,1	-	0,1	0,3	0,7	-	0,6	0	0,1	0,1	0	0,2				
	Composés oxygénés(%)			9,1	3,5	6,4	9,6	12,5	6,8	7,9	9,7	7,6	13,8	7,7	15,4	15,3	18,7	7,3	13,9	14,7	19,2				
	Monoterpènes oxygénés(%)			4,6	1,5	3,2	3,5	4,9	1,8	2,7	4,4	1,2	2,3	2,6	9,1	1,5	3,5	1,9	2,0	3,5	2,1				
	Sesquiterpènes oxygénés(%)			1,2	0,7	0,7	1,6	3,2	1,1	2,3	1,6	1,7	4,0	1,6	1,7	4	1,6	0,8	2	0,6	0,8				

Composés oxygénés non-
terpéniques(%)

3.3 1.3 2.5 4.6 4.4 3.9 2.9 3.7 5.9 7.5 3.5 4.6 9.8 13.6 4.6 11.7 10.6 3.4 23.3

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1), ^bRI_{LIT}: indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005 [5,6], ^cRI_a: indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1, IR : indices de rétention, SM : spectrométrie de masse en mode impact électronique Ref: des données de la littérature König et Coll., 2001[5], tr : trace (<0.05%), les stations : Bhira1 (L1), Bhira2 (L2), Bhira3 (L3), Bhira4 (L4), Bhira5 (L5), Bhira6 (L6), Bhira7 (L7), Bhira8 (L8), Bhira9 (L9), Bédar1 (L10), Bédar2 (L11), Bédar3 (L12), Bédar4 (L13), Bédar5 (L14), Bédar6 (L15), Bédar7 (L16), Bédar8 (L17), Bédar19 (L18), L :huile collective, Max : Valeur maximale, Min : valeur minimale

Afin d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage, nous avons soumis ces résultats à une Analyse en Composante Principale (ACP) (**figure 39**) et parallèlement nous avons mis en œuvre une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) (**figure 40**). Nous remarquons, globalement, que les stations d'une même altitude se positionnent à proximité immédiate les uns des autres témoignant d'une faible variabilité intra-station. En revanche, les échantillons provenant d'altitudes différentes montrent une forte variabilité chimique interspécifique.

Deux grands groupes, notés **A** et **B** se distinguent nettement (**figures 39 et 40**) :

- ❖ Le groupe **A** caractérisé par des abondances particulières en **C₂₉** Myrténal , **C₉** β -

Pinène and **C₅₇** 2-Phényléthyle-Isovalérate.

Ce groupe **A** correspond aux 5 stations dont le végétal fournit un rendement moyen de 0,03% en huile essentielle.

- ❖ Le groupe **B**, caractérisé par des abondances particulières en : **C₅** α - Pinène, **C₁₀** Myrcène et **C₁₂** 3-Carène.

Tableau 15: Regroupement des échantillons de *P.pinaster* de l'analyse statistique.

^a Composés	Groupe A (L13-L17)		Groupe B (L1-L11, L)	
	Variation ^b	^b Moyenne	Variation ^a	Moyenne ^b
C5 α- Pinène	18-40.7	34.6	0-72.7	39.14
C9 β- Pinène	19.6-33.6	25.4	0-15.6	4.9
C10 Myrcène	1-8.7	3.5	0-13.6	5.3
C12 3-Carène	0-0.1	0.1	0-15	7.2
C29 Myrténal	0-7.5	4.3	0.1-3.1	0.7
C 36 E-β-Caryophylène	0.3-25.1	4.9	2-15	5.7
C37 α-Humulène	0-30.7	1.02	0.1-2.4	4.05
C38 Abeita-6,13-diène	0-7.4	2.15	0.2-17.3	1.6
C69 2-Phényléthyle-Isovalérate	1.1-10.4	5.7	0.4-3.5	1.6

^a La numérotation se rapporte à ceux du tableau 10; ^b pourcentage des composés (%).

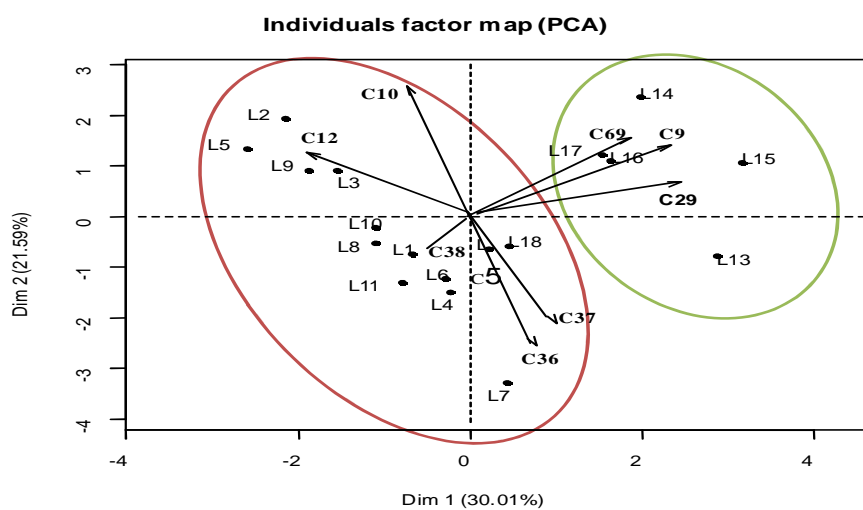


Fig.39 : ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *P.pinaster*.

Dendrogram of agnes(x = pinaster, metric = "euclidean", stand = T, method = "ward")

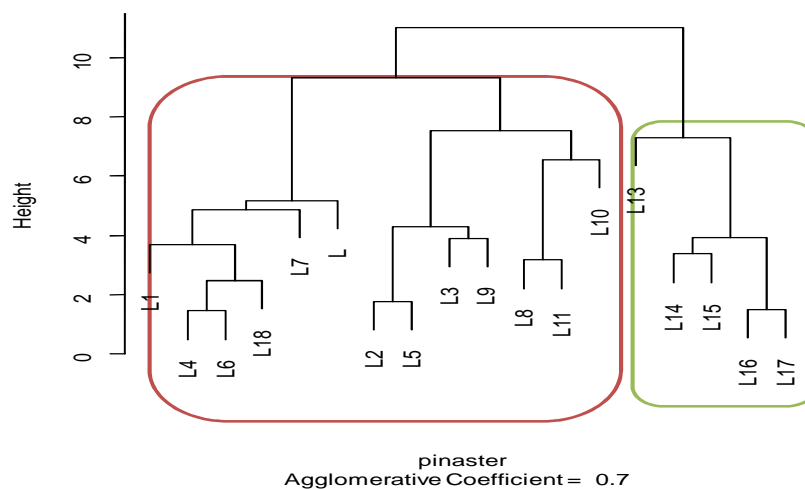


Fig. 40 : CHA des compositions chimiques de *P. pinaster* de l'ouest Algérien

V.5 Etude comparative de la composition chimique des huiles essentielles des trois espèces

En comparant la composition chimique des huiles essentielles des trois plantes étudiées, les monoterpènes hydrocarbonés sont plus importants que les monoterpènes oxygénés, aussi, cette étude comparative 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%) ; et Terpinolène (8,3%).
- Racines : α -Pinène (87,4%) ; Trans-*p*-Caryophyllène (3,5%) et β -Pinène (1,3%).

- Cas du *P. pinea* :

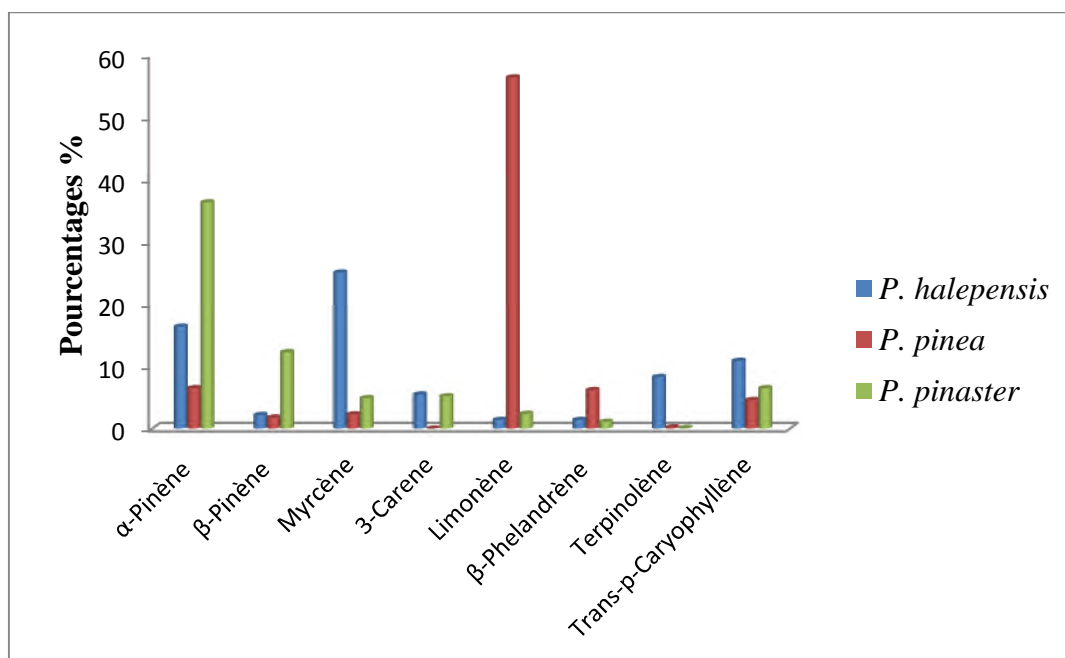
- Parties aériennes : Limonène (56,5%) ; α -Pinène (6,5%) ; β -Phelandrène (6,2%) et Trans-*p*-Caryophyllène (4,6%).

- Racines : Limonène (66,3%) ; Trans-*p*-Caryophyllène (9,6%) ; Myrcène (3,2%) and α -Pinène (2,9%).

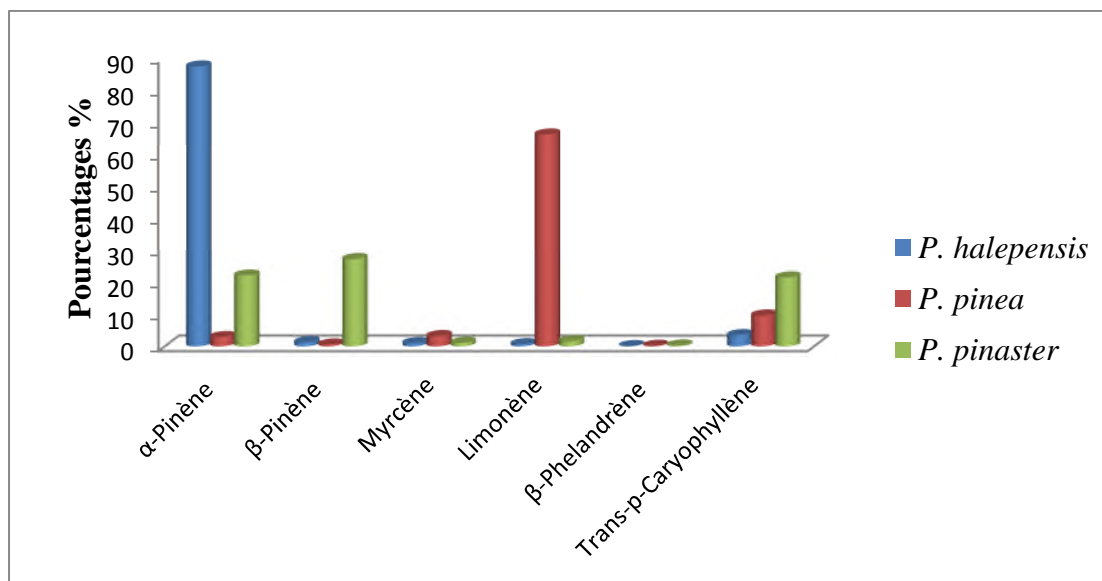
- Cas du *P. pinaster* :

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

Ces différences observées dans les compositions chimiques des huiles étudiées et celles des autres origines, pourraient 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 [2, 3, 14].



Histogramme 6: Pourcentage des composés majoritaires des parties aériennes des trois *Pinus*



Histogramme 7: Pourcentage des composés majoritaires des racines des trois *Pinus*

REFERENCES

- [1] Ustun O., Sezik E., Kurkcuoglu M., Baser K.H.C., Study of the essential oil composition of *Pinus sylvestris* from Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, **2006**, 42: 26–31.
- [2] Lopes N.P., Kato M.J., Aguiar Andrade H., Soares Maia J.G., Yoshida M., Orcadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. *Phytochemistry*, **1997**, 46: 689-693.
- [3] Vasconcelos Silva M.G., Craveiro A.A., Abreu Matos F.J., Machado M.I.L., Alencar J.W., Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*. *Fitoterapia*, **1999**, 70: 32-34.
- [4] Council of Europe, Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A, Ed. Saint Ruffine, France. **1996**.
- [5] König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, **2001**.
- [6] National Institute of Standards and Technology, NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database, Gaithersburg, MD.[<http://webbook.nist.gov/chemistry>], **2005**.
- [7] Tazerouti F., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y., Meklati B.Y., Favre- Bonvin J., Bobenrieth M.J., Analysis of essential oils from needles of *Pinus halepensis* Mill. by gas chromatography and mass spectrometry. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 1993, 26(3): 161-176.
- [8] Dob T., Berramdane T., Chelghoum C., Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie*, **2005**, 8(11-12): 1939-1945.
- [9] 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.
- [10] Hmamouchi M., Hamamouchi J., Zouhdi M. & Bessiere J. M., Chemical and Antimicrobial Properties of Essential Oils of Five Moroccan *Pinaceae*. *Journal of Essential Oil Research*, **2001**, 13(4): 298-302.
- [11] Ustun O., Sezer Senol F., Kurkcuoglu M., Erdogan Orhan I., Kartal M., Baser H.C.K., Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of

extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Corps and product*, **2012**, 38: 115-123.

[12] **Roussis V.**, Petrakis P.V., Ortiz A., Mazomenos E.B., Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*. **1995**, 39(2): 357-361.

[13] **Abi-Ayad M.**, Abi-Ayad FZ., Lazzouni HA., Rebiahi S.A., Ziani-Cherif C., Bessiere JM., Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2011**, 5(22): 5433-5436.

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

[15] **Nasri N.** , Tlili N. , Triki S. , Elfalleh W. , Chéraif I. & Khaldi A., Volatile Constituents of *Pinus pinea* L. Needles. *Journal of Essential Oil Research*, **2011**, 23(2): 15-19.

[16] **Tumen I.**, Hafizoglu H., Kilic A., Dönmez IE., Sivrikaya H., Reunanen M., Yields and Constituents of Essential Oil from Cones of *Pinaceae* Grown in Turkey. *Molecules*, **2010**, 15: 5797-5806.

[17] **Tumen I.**, Hafizoglu H., of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, **2012**, 85:199-207.

[18] **Amri I.**, Hamrouni L. , Fezzani M.T. , Jamoussi B. , Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, **2012**, 85(2):199-207.

Chapitre VI

CHAPITRE VI : Investigation biologique des huiles essentielles du genre *Pinus*

VI.1 Introduction

Depuis l'Antiquité, les extraits aromatiques des plantes ont été utilisés dans le processus de stress oxydatif et la lutte contre les maladies infectieuses [1]. Mais la découverte des antioxydants synthétiques et des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire. Aujourd'hui, l'intérêt porte aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques qui 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.

Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude des activités, anti-oxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de trois du genre *Pinus* d'Algérie.

VI.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire Antibiotiques, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAPSAB), Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen. Le choix des bactéries s'est porté sur douze souches de bactéries fréquentes généralement en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes (Gram positif et Gram négatif).

Les souches bactériennes utilisées sont :

❖ Bactéries à Gram négatifs :

(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Proteus mirabilis* ATCC 35659).

❖ Bactéries à Gram positifs

(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313)

Nous avons testé nos huiles contre trois levures (*Candida albicans* ATCC 444, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 26790.),

Ces souches sont des lots de « *American Type Culture Collection* » : ATCC.

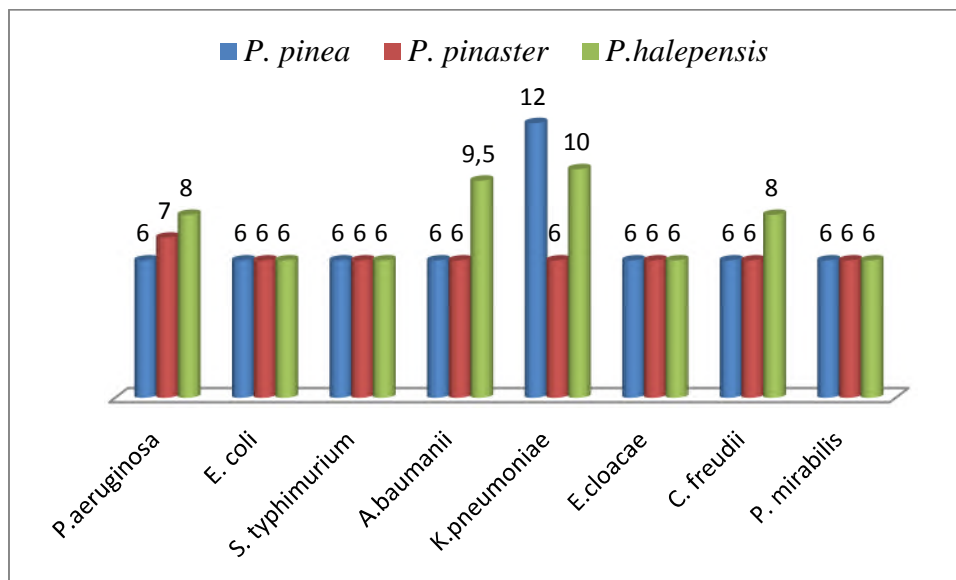
L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée selon deux méthodes :

Méthode de diffusion

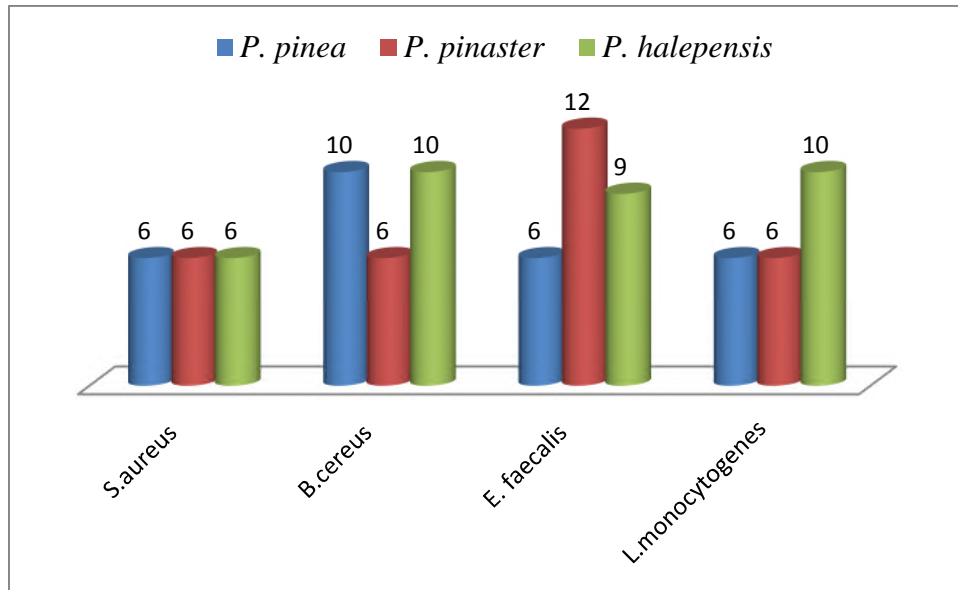
❖ Les parties aériennes

L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de trois *Pinus* contre les souches employées, a été étudié par la technique de diffusion des disques sur gélose.

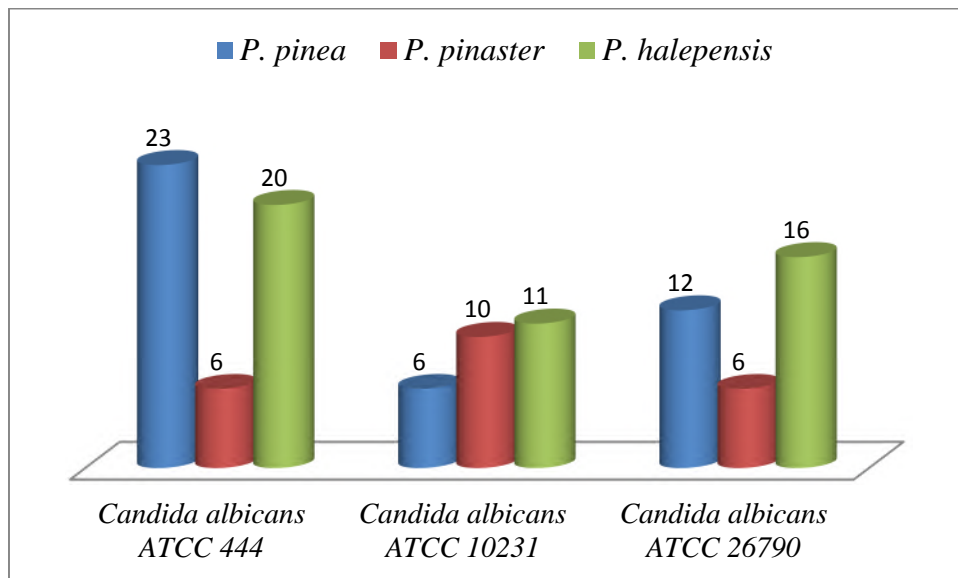
L'effet antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes est présenté dans les histogrammes ci-dessous :



Histogramme 08: Diamètres d'inhibition des H.Es de trois parties aériennes de *Pinus* contre les bactéries à Gram négatifs.



Histogramme 09: Diamètres d'inhibition des H.Es de trois parties aériennes de *Pinus* contre les bactéries à Gram positifs.



Histogramme 10: Diamètres d'inhibition des H.Es de trois parties aériennes de *Pinus* contre *Candida albicans*.

Comme le montrent les histogrammes (8, 9, 10) les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles des parties aériennes variaient de 6 à 23 mm.

Les résultats montrent une activité moyenne vis-à-vis des bactéries à Gram-négatif *K.pneumoniae* (zone d'inhibition de 12mm et 10 mm) pour l'huile essentielle de *P.pinea* et *P. halepensis* respectivement, aussi l'huile essentielle de *P.halepensis* montre un effet inhibiteur moyen contre *A.baumannii*. Nous remarquons aussi que les trois huiles n'ont montré aucun effet contre *P.aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E.cloacae*, *C. freudii*, *P. mirabilis*.

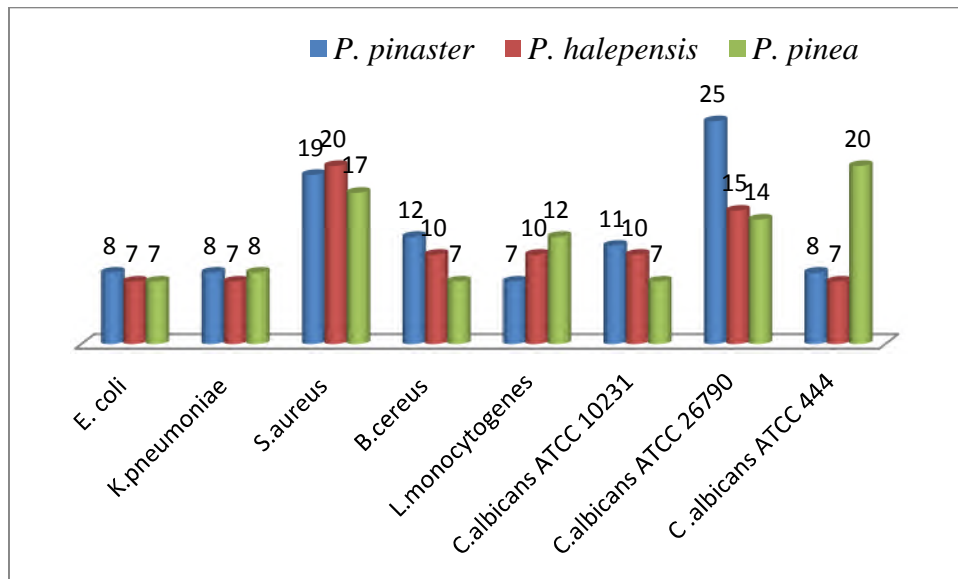
De plus, l'huile essentielle de *P. pinaster* montre aussi une activité moyenne vis-à-vis de souche bactérie à Gram-positif *Enterococcus faecalis* (zone d'inhibition de 12 mm). Aucune zone d'inhibition n'est observée autour des disques à la charge 10 µL contre 8 micro-organismes à Gram-négatifs et à Gram-positifs parmi lesquels : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*..., l'huile est inactive contre ces bactéries.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *P. halepensis* de Ghazaouet (Ouest du Nord de l'Algérie) est évaluée contre quatre souches de bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*, en utilisant la méthode de diffusion sur disque [2]. L'huile essentielle montre une forte activité contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Dans le contraste, l'huile est inefficace sur l'inactivation de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. La variation de la composition chimique de l'huile essentielle pourrait être responsable de ces différences d'activités antibactériennes.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle *Pinus halepensis* par la méthode de diffusion en disque a montré une activité modérée sur *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *P.halepensis* montre une inhibition moyenne contre *Candida albicans ATCC 10231* avec des zones d'inhibition de 11 mm, aussi une activité modérée est observée pour l'huile essentielle de *P.pinea* contre *Candida albicans ATCC 26790* avec un diamètre d'inhibition de 12. mm. Par contre, une bonne activité est remarquée vis-à-vis *Candida albicans ATCC 444* de l'huile essentielle de *P.pinea* et *P. halepensis* (23mm et 20mm respectivement) aussi une forte activité de l'huile de *P.halepensis* contre *Candida albicans ATCC 26790* (16 mm) est observée. Ce dernier est plus intéressant que celui publié dans la référence [2].

❖ Les racines



Histogramme 11 : Diamètres d'inhibition des H.Es de trois racines de *Pinus* contre les bactéries et les levures.



Fig.41 : Diamètre d'inhibition de H.E de *P. pinaster* contre *Bacillus cereus*.



Fig.42 : Diamètre d'inhibition de H.E de *P. pinaster* contre *Staphylococcus aureus*.



Fig.43 : Diamètre d'inhibition de H.E de *Pinus pinaster* contre *Candida albicans* ATCC 10231.

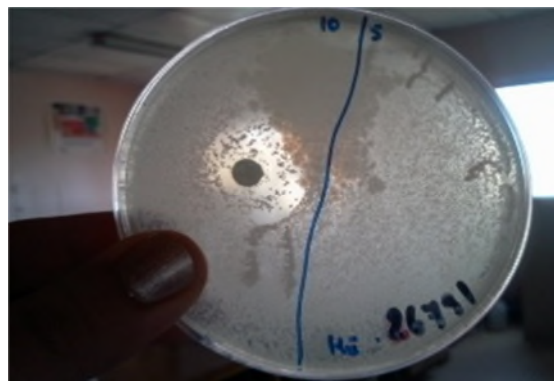


Fig.44 : Diamètre d'inhibition de H.E de *Pinus pinaster* contre *Candida albicans* ATCC 26790.

L'histogramme 11 résume l'évaluation de la sensibilité des bactéries choisies vis-à-vis des huiles essentielles des racines de *P.pinea*, *P.pinaster* et *P.halepensis* provenant des stations de Nedroma.

Les résultats montrent que les souches bactériennes à Gram (+) testées sont très sensibles aux huiles essentielles de trois *Pinus*, notamment pour *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).

D'autre part, les huiles essentielles des racines des *Pinus* étudiées, ont été testées contre trois levures. Les huiles essentielles de *P.pinea* et *P. pinaster* se sont révélés efficaces 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 montrée inefficace. *Candida albicans* (ATCC 10231) s'est dévoilé être résistance pour les trois HE.

✚ Méthode de dilution (CMI)

Les résultats des concentrations minimales bactéricides (CMI) des huiles essentielles des parties aériennes et des racines de trois *Pinus* sont reportés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Résultats de l'activité antimicrobienne utilisant la méthode de dilution.

Microorganisms	Méthode de Dilution CMI (µg/ml)					
	P.H.A	P.H.R	P.P.A	P.P.R	P.M.A	P.M.R
<i>Escherichia coli</i>	227.7	113.63	227.7	227.7	227.7	227.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	227.7	28.4	113.63	227.7	113.63	113.63
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	227.7	28.4	113.63	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	227.7	56.81	56.81	113.63	56.8	28.4

P.H.A : Parties aériennes de *Pinus halepensis*, **P.H.R** : Racines de *Pinus halepensis*, **P.M.A** : Parties aériennes de *Pinus pinaster*, **P.M.R** : Racines de *Pinus pinaster*, **P.P.A** : Parties aériennes de *Pinus pinea*, **P.P.R** : Racines de *Pinus pinea*

L'activité antimicrobienne des racines et des parties aériennes des huiles essentielles a été confirmée par le dosage de bouillon de micro dilution. Comme, le montre le tableau 16, les résultats les plus prometteurs étaient obtenus à partir de l'huile des racines *P.halépaisis* et de *P.pinea* qui avaient la valeur de CMI la plus faible (28.4µg/ml) contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* respectivement.

Les huiles essentielles de la partie aérienne de *P.pinaster* et *pinea* ont également montré un effet antimicrobien contre *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 56 µg /ml et 113.63 µg /ml, respectivement.

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 [3,4]. Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans les huiles essentielles [5,6].

VI.3 Evaluation de l'activité antioxydante

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité anti-oxydante *in vitro* de nos échantillons a été réalisée par deux techniques chimiques à savoir : le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer.

➤ Le piégeage du radical libre DPPH[•]

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron.

Pour se renseigner sur l'activité antioxydante de nos échantillons, nous avons réalisé un suivi de la réaction de la réduction par mesure de l'absorbance dans un temps défini, ce qui est bien montré dans les **Fig. 43** et **Fig.44**. On a remarqué expérimentalement, que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à celle de la solution de la vitamine C, ainsi la solution change de couleur instantanément du violet au jaune.

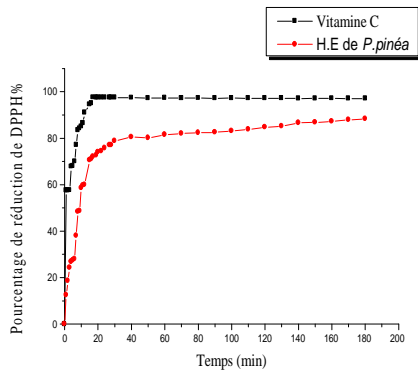


Fig.45 : Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur du DPPH[•]

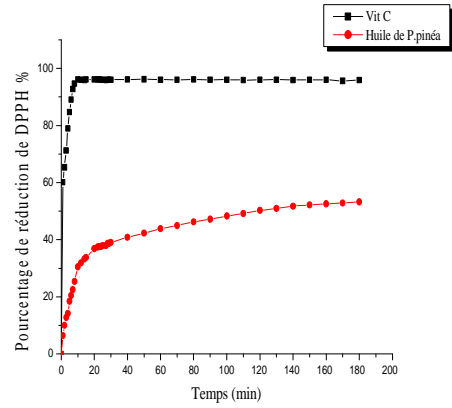
A différentes concentrations de l'antioxydant testé (Acide ascorbique, les huiles essentielles des parties aériennes de *P.pinea* et *P.pinaster*), la cinétique de réduction du DPPH[•] est suivie au cours du temps jusqu'à l'obtention d'un équilibre traduit par la présence d'un palier, les résultats sont indiqués dans les **Fig.45**, **Fig.46**. On constate que l'acide ascorbique a une diminution rapide de l'absorbance dans les premières minutes.

Pour l'huile essentielle de *P.pinea*, Cette zone est observée au bout de 27 min à une concentration de 12mg/ml et au bout de 31 minutes pour *P.pinaster* à la même concentration. La réaction entre le DPPH[•] et l'acide ascorbique donneur d'hydrogène atteint l'équilibre au bout d'un temps très court par rapport aux huiles essentielles testées.

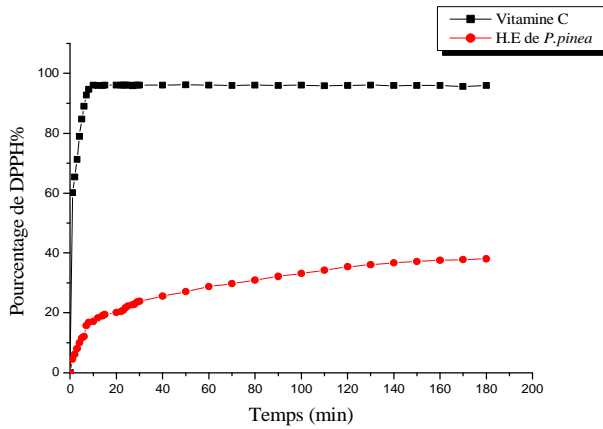
CC₁=12mg/ml



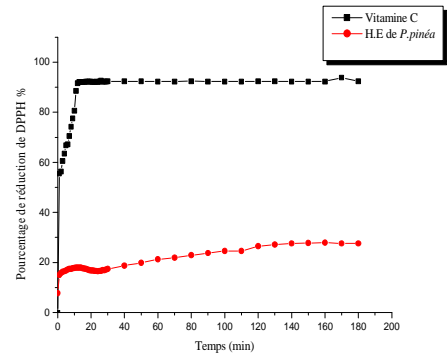
CC₂=6mg/ml



CC₃=3.6mg/ml



CC₄=1.29mg/ml



CC₅=0.46mg/ml

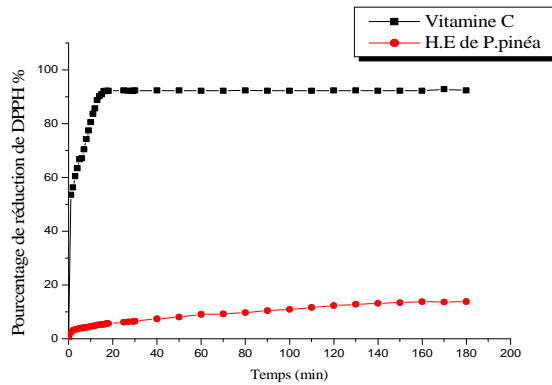
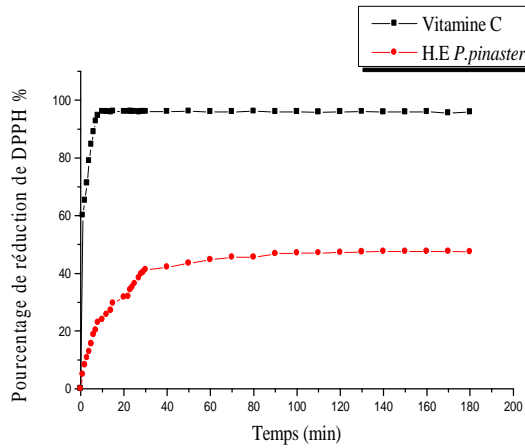
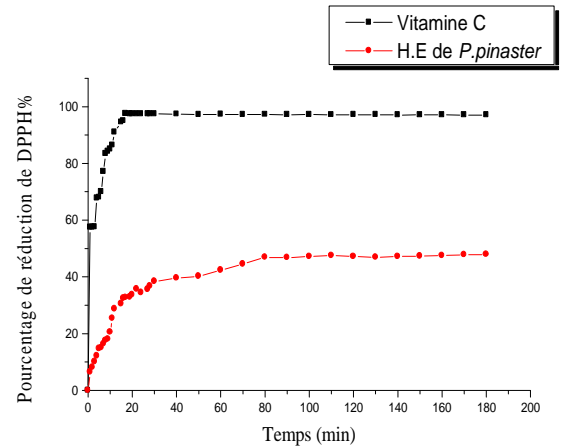


Fig. 46 : Pourcentage de réduction de DPPH^{*} de l'H.E de *P.pinea* et de la vitamine C en fonction de temps.

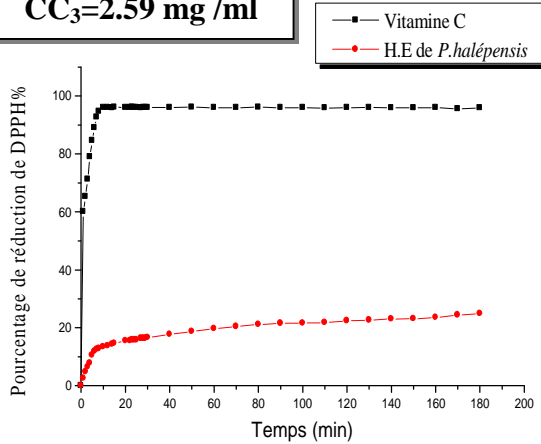
CC₁=12mg/ml



CC₂=7.2mg /ml



CC₃=2.59 mg /ml



CC₄=1.55mg /ml

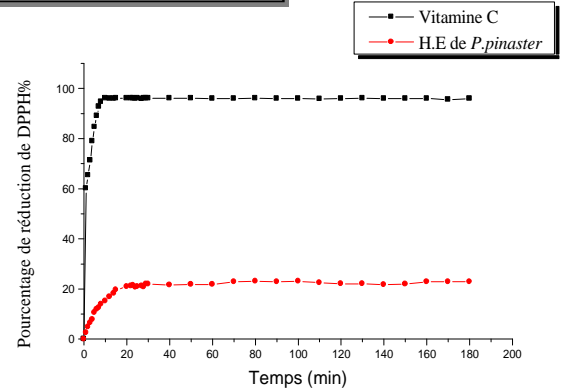


Fig. 47 : Pourcentage de réduction de DPPH^{*} del' H.E de *P. pinaster* et de la vitamine C. en fonction de temps.

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre T_{eq} varie en fonction des concentrations :

- Entre 3 minutes : réaction très rapide
- Entre 10-30 minutes : réactions intermédiaires [7,8].

A partir de la courbe traçant la relation entre le pourcentage de réduction $\%(\text{DPPH}^{\bullet})$ et la concentration de composé, on déduit par interpolation graphique la concentration IC_{50} et le temps $T_{IC_{50}}$ [9]. Pour notre cas nous avons déterminé les IC_{50} et $T_{IC_{50}}$ expérimentalement.

Les paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH^{\bullet} pour les trois échantillons testés sont présents dans le Tableau ci-dessous :

Tableau 17 : Les paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction.

	Teq (min)	IC₅₀ (mg /ml)	T I C₅₀ (min)
Vitamine C	9	0.048	10
<i>P.pinea</i>	32	6	15
<i>P.pinaster</i>	35	12	180

Teq : Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, IC_{50} :

➤ **Méthode de FRAP**

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos composés est déterminée par rapport à la vitamine C. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir réducteur exprimé en absorbance en fonction de la concentration.

Les résultats du test de réduction du fer (FRAP) des huiles essentielles sont présentés sur la figure suivante

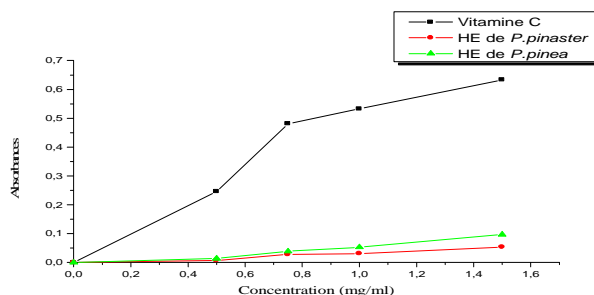


Fig.48 : Absorbance en fonction de la concentration des huiles essentielles et la vitamine C.

Nous avons remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne une solution de concentration la solution change de couleur instantanément du jaune au vert. L'examen des résultats de ce test montre une fois encore que nos composés possèdent des activités antioxydantes faibles.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **Heath** H.B., "Source book of flavours." Ed. Springer, 1st edition, **1981**.
- [2] **AbiAyad** M., AbiAyad. F.Z., Lazzouni H.A., Rebiahi S.A., Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *Journal Natural Product Plant Ressource*, **2011**, 1: 33-36.
- [3] **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.
- [4] **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.
- [5] **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.
- [6] **Tzakou** O., Bazos L., Yannitsaros A., Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. From Greece. *Flavour and Fragrance Journal* **2007**; 22(5): 358–362.
- [7] **Sanchez-Moreno** C., Larrauri José A., Saura-Calixto F., A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1998**, 76(2): 270-276.
- [8] **Scherer** R., Godoy H. T., Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazylmethod. *Food Chemistry*, **2009**, 112: 654-658.
- [9] **Yilmaz** Y., Toledo, R.T. Major Flavonoids in grape seeds: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **2004**, 52: 255-260.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques qui se trouvent dans la wilaya de Tlemcen située à l'Ouest d'Algérie, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois espèces appartenant au même genre *Pinus* de la famille des Pinacées. Ce sont des arbres vivaces, spontanés, se trouvant dans la région de la méditerranée, ils dégagent une odeur forte, ils sont connues sous le nom « senouber » par les populations locales. Ces plantes médicinales sont encore utilisées dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme anti-inflammatoire, analgésique et pour le traitement contre la bronchite.

L'obtention des huiles essentielles des trois espèces (racines, feuilles/tiges, fruits) de *Pinus* a été accomplie par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. L'analyse des huiles essentielles (HEs) a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par CPG couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) en utilisant deux colonnes, l'une polaire et l'autre apolaire.

Les huiles essentielles des différentes parties (aiguilles, rameaux, cônes) de *P.halepensis* sont caractérisées par la prédominance des hydrocarbonés (74.4-93.6%) de l'huile totale. Cette dernière est caractérisée par sa richesse en monoterpènes hydrocarbonés (14-53.1%) et en sesquiterpènes hydrocarbonés (14.8-32.1%). En revanche, les diterpènes sont présents en faible quantité. Il est à noter que les constituants hydrocarbonés majoritaires pour chaque partie sont :

α -Pinène (12.6 %) et Trans-Caryophyllène (13,8%) les aiguilles, le Myrcène (9.2-37.3%) et Trans-Caryophyllène (24,9-25.4%) dans les cônes et les rameaux respectivement.

L'étude de la variabilité interspécifique et intra spécifique de *P.halepensis* réalisée sur les dix stations réparties dans l'ouest d'Algérie, montre que les profils des huiles essentielles présentent une très grande homogénéité. En revanche, les résultats des analyses des huiles essentielles en fonction du cycle végétatif et la durée du séchage de la plante révèlent que la composition chimique des huiles essentielles varie, considérablement, par rapport à la période de la récolte et la durée de stockage de la plante.

En ce qui concerne le *P.pinea*, les analyses chimiques montrent que l'huile des parties aériennes (les aiguilles, les rameaux, les bourgeons et les cônes) sont principalement composées par des composés hydrocarbonés (27.4-88.5%), le Limonène (17.7à 69.3%) était le principal composant.

L'huile essentielle de l'*P. pinaster*, elle renferme en majorité des monoterpènes hydrocarbonés (54.3-78.4%), des sésquiterpènes hydrocarbonés (10.2, 17.2 %), des diterpènes hydrocarbonés (0.5-19.6%) et des hydrocarbonés non terpénique (1-8.4%).

L'analyse des trois racines de *Pinus* 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.

La deuxième partie de cette étude concerne la valorisation des H.Es. Pour ce faire, les activités biologiques, notamment, antimicrobiennes et anti-oxydantes sont évaluées. Les tests antimicrobiens sont effectués sur douze souches de bactéries à Gram-négatives et à Gram-positives et trois levures. Les résultats révèlent que les huiles essentielles montrent une activité antibactérienne modérée sur *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis* et une bonne activité antifongique sur *Candida albicans*.

Les tests antioxydants sont réalisés par deux méthodes : le piégeage du radical libre DPPH^{*} et le potentiel réducteur du fer (méthode de FRAP). Les deux méthodes révèlent l'activité antioxydante modérée.

Travaux de recherche

Travaux de recherche

PUBLICATIONS :

- 1) Hocine ALLALI ; Ilyas CHIKHI ; Mohamed El Amine DIB ; Alain MUSELLI ; **Nadia FEKIH** ; Nawel MELIANI ; Mohammad A. KAMAL ; Boufelfja TABTI ; Jean COSTA

“Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and Hydro-distillation”, *Natural Products: An Indian Journal*, **2013**; 9(6): 258-263.

Available online at: <http://cta@tsijournals.com>

- 2) **Nadia FEKIH** ; Hocine ALLALI ; Salima MERGHACHE ; Faïza CHAIB ; Djamila MERGHACHE ; Mohamed El Amine DIB ; Nassim DJABOU ; Alain MUSELLI ; Boufelfja TABTI ; Jean COSTA

“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. doi:10.1016/S2222-1808(14)60323-6.

Available online at: <http://www.apjtd.com>

- 3) Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Karima BECHLAGHEM ; **Nadia FEKIH** ; Alain MUSELLI ; Nassim DJABOU ; Mohammed El Amine DIB ; Boufelfja TABTI ; Nouredine HALLA ; Jean COSTA

“Assessment of in Vitro Antimicrobial Potency and Free Radical Scavenging Capacity of the Essential Oil and Ethanol Extract of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia* Growing in Algeria”, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease (APJTD)*, **2014**; 4(5): 356-362. doi:10.1016/S2222-1808(14)60587-9.

Available online at: <http://www.apjtd.com>

COMMUNICATIONS:

🚩 *Communications Nationales:*

- 1) **Nadia FEKIH** ; Batoul BENYELLES ; Kawther YOUNES ; Salima MERIAH ; Hocine ALLALI ; Boufeldja TABTI ; Nassim DJABOU
“ Contribution à l’étude chimique d’une plante médicinale *Zizyphus lotus* L.”. Premier Congrès International-Santé au Naturel, 7-9 Décembre **2010**, Mostaganem, Algérie.
- 2) **Nadia FEKIH** ; Hocine ALLALI ; Dalila SELADJI ; Salima MERGHACHE ; Alain MUSELLI ; Nassim DJABOU ; Mohamed El Amine DIB ; Jean COSTA ; Boufeldja TABTI
“ *In vitro* evaluation of *Pinus pinaster* for its antimicrobial and antioxidant potential”, 1^{ère} Journée Scientifique des Sciences de l’Agriculture, Environnement et Santé, 03 Juin **2014**, Tlemcen, Algérie.
- 3) Batoul BENYELLES ; Hocine ALLALI ; **Nadia FEKIH** ; Alain MUSELLI ; Nassim DJABOU ; Mohamed El Amine DIB ; Jean COSTA ; Boufeldja TABTI
“Assessment of antioxidant activity of *Tropaneolium majus* L. (Garden Nasturtium) aerial parts extracts”, 1^{ère} Journée Scientifique des Sciences de l’Agriculture, Environnement et Santé, 03 Juin **2014**, Tlemcen, Algérie.
- 4) Batoul BENYELLES ; Hocine ALLALI ; **Nadia FEKIH** ; Karima BECHLAGHEM ; Julien PAOLINI ; Mohamed El Amine DIB ; Alain MUSELLI ; Nassim DJABOU ; Jean COSTA ; Boufeldja TABTI
“Antimicrobial activity of essential oil of *Daucus gracilis* from Algeria”. The Second International Conference on “Natural Health” (ICONAHE), 26-28 Octobre **2014**, Mostaganem, Algérie.
- 5) **Nadia FEKIH** ; Hocine ALLALI ; Salima MERGHACHE ; Batoul BENYELLES ; Karima BECHLAGHEM ; Ilyes CHIKHI ; Alain MUSELLI ; Jean COSTA ; Boufeldja TABTI
“Total antioxidant activity and antimicrobial potency of essential oils of *Pinus pinea* roots growing in Algeria”. The Second International Conference on “Natural Health” (ICONAHE), 26-28 Octobre **2014**, Mostaganem, Algérie.

🚩 **Communications Internationales:**

- 1) **Nadia FEKIH**; Hocine ALLALI; Salima MERGHACHE; Alain MUSELLI; Djamila MERGHACHE; Mohamed El Amine DIB; Jean COSTA; Boufeldja TABTI
“Chemical composition, antibacterial and free radical scavenging activities of *Pinus halepensis* Miller growing in west northern of Algeria”. 5th International Congress on Medicinal and Aromatic Plants-CIPAM 2014, 17-20 Mars **2014**, Zarzis, Tunisie.
Site Web: <http://www.cipam2014.com>
- 2) **Nadia FEKIH**; Hocine ALLALI; Salima MERGHACHE; Batoul BENYELLES; Alain MUSELLI; Nassim DJABOU; Mohamed El Amine DIB; Jean COSTA; Boufeldja TABTI
“Chemical composition and antimicrobial activity of *Pinus pinea* from Algeria”. 45th International Symposium on Essential Oils (ISEO), 7-10 September **2014**, Istanbul, Turquie.
Site Web: <http://www.iseo2014.com>
- 3) Batoul BENYELLES; Hocine ALLALI; **Nadia FEKIH**; Alain MUSELLI; Nassim DJABOU; Mohamed El Amine DIB; Jean COSTA; Boufeldja TABTI
“Essential Oils Composition Variability of *Daucus gracilis* growing in Algeria”. 45th International Symposium on Essential Oils (ISEO), 7-10 September **2014**, Istanbul, Turquie.
Site Web: <http://www.iseo2014.com>

Annexes

Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and hydro-distillation

Hocine Allali¹, Ilyas Chikhi¹, Mohamed El Amine Dib^{1*}, Alain Muselli³, Nadia Fekih¹, Nawel Meliani¹, Mohammad A.Kamal², Boufelfja Tabti¹, Jean Costa³

¹Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen, (ALGERIA)

²Metabolomics & Enzymology Unit, Fundamental and Applied Biology Group, King Fahd Medical Research Center, King Abdulaziz University, P. O. Box 80216, Jeddah 21589, (SAUDIARABIA)

³Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, (FRANCE)

E-mail: a_dibdz@yahoo.fr

ABSTRACT

The essential oil of a *Mentha spicata* L. (collected from Algeria) was extracted by hydrodistillation and solid phase micro-extraction (SPME). The oils have been studied by GC and GC-MS. Thirty seven compounds identified in the aerial parts oil extracted by hydrodistillation, the principal components being carvone (48.42%), eucalyptol (17.6%) and neoiso-dehydrocarveol acetate (11.7%). On the other hand, the oil extracted by SPME showed eucalyptol (55.1%) as the principal component with moderate amounts of carvone (7.2%), (Z)-dehydro-carvone (4.3%), cis-carveol (3.9%) and carvacrol (3.0%). In addition, it should be noted that 11 compounds identified only in the volatile fractions extracted using HS-SPME and not identified in essential oils. Isolated essential oil was tested for radical-scavenging ability using the stable DPPH radical assay, which showed concentration-dependant antiradical activities, i.e. a percent of inhibition of 52.21% in the presence of 12.6 mg/mL.

© 2013 Trade Science Inc. - INDIA

KEYWORDS

Mentha spicata L.;
Lamiaceae;
Essential oil;
Chemical composition;
GC-MS;
SPME.

INTRODUCTION

Mentha is a well-known genus (family Lamiaceae) for medicinal and aromatic value. The genus *Mentha* includes 25–30 species that grow in the temperate regions of Eurasia, Australia and South Africa^[1]. These species showed considerable chemical diversity in essential oil composition. The genus is under cultivation from tropical to temperate climate of America, Europe,

China, Brazil, India, etc^[2]. *M. spicata* L. is a creeping rhizomatous, glabrous and perennial herb with a strong aromatic odor. The oil of *M. spicata* is rich in carvone and presents a characteristic spearmint odor^[3]. The species has been found useful as digestive and gastro-stimulant. Leaves are popularly used as tea flavouring agent, while herbalists use whole plant as carminative^[4]. The fresh and dried plants and their essential oils are widely used in food, cosmetic, confectionary, chewing

gum, toothpaste and pharmaceutical industries^[5]. The essential oil of *M. spicata* showed strong insecticidal and mutagenic activity^[6]. Different chemotypes are characterized by distinct smells and bioactivities, indicating different uses in aromatic and medicinal industries^[7]. For instance, European enjoy carvone-scent, while Chinese prefer menthol-scent^[8]. *Mentha* L. accessions from different geographical population generally show numerous variations in the essential oil properties^[8,9]. Several chemotypes are observed in *Mentha* from various locations. For example, four chemotypes of *M. spicata* are found in Greece, characterized by the dominant occurrence of linalool, carvone/dihydrocarvone, piperitone oxide/piperitetone oxide, and menthone/isomenthone/pulegone, respectively^[8,9]. Although the genus *Mentha* has been widely studied no investigations have been performed on the entire set of flavour volatiles of *M. spicata*. We have applied the headspace solid phase micro extraction (HS-SPME) and hydrodistillation extraction (HD) to extract the aroma volatiles of Algerian *M. spicata* before analysis. Briefly, the HS-SPME is used for the extraction of volatile compounds by the use of a fused silica fibre coated with different stationary phases. This is a common technique to evaluate the flavour compounds of various foods such as vegetables, fruits, juices, soft drinks or alcoholic beverages as recently reviewed from^[10]. To the best of our knowledge, no studies have been published on the characterization of Algerian *Mentha spicata* aroma compounds with SPME. In this paper, we report on the essential oil composition of *M. spicata*, growing in Algeria, extracted by hydrodistillation (HD) and solid phase micro-extraction (SPME) followed by GC-MS analysis to obtain the most complete profile and get a better knowledge of components. The final objective of the present study is to assess the antioxidant activity of essential oil.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and oil isolation

Mentha spicata L. was collected in Mai 2011 from Beloul 40km far from Saïda (868 (m), 34° 50' 00" N, 0° 09' 00" E) in the west northern region of Algeria. Voucher specimen was identified by Pr Nouri BENABADJI of Department of Biology - University

of Tlemcen, Algeria and deposited in the institutional herbarium. The plants were cut at ground surface and taken to laboratory to extract essential oil. Chopped plants were used fresh for determination of essential oil content by hydrodistillation method using Clevenger-type apparatus at 60°C for 3 h. The essential oil was dried with anhydrous sodium sulphate, stored at 4°C and used for GC-MS analysis. The essential oil content (%) was determined on fresh weight basis as an average of three samples.

Gas chromatography analysis (GC)

GC analysis was performed using a Perkin-Elmer Clarus 600 GC apparatus (Walton, MA, USA) equipped with a single injector and two flame ionization detectors (FID). The analysis was carried out using two fused silica capillary columns (60 m; 0.22 mm i.d.; film thickness 0.25 µm) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). The operating conditions were as follows: Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Helium was used as carrier gas (1 mL/min), the injection volume was 0.1 µL, split ratio was adjusted at 1:80, the oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at the rate of 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 30 min.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS)

The oils were investigated using a Perkin Elmer Turbo Mass quadrupole analyzer, directly coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Other GC conditions were the same as described above. Ion source temperature: 150°C; energy ionization: 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35 – 350 Da; scan mass: 1s. Oil injected volume: 0.1 µL.

HS-SPME conditions

The aerial parts of *M. spicata* were cut roughly with scissors (1 - 2 cm long) before subsection to HS-SPME. The SPME device (Supelco) coated with divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, 30 µm) was used for extraction of the plant volatiles. Optimization of conditions was carried

Full Paper

out using fresh aerial parts of the plant (1 g in a 20 mL vial) and based on the number and the sum of total peak areas measured on GC-FID. Temperature, equilibration time and extraction time were selected after nine experiments combining four temperatures (30, 50, 70 and 90°C), four equilibration times (20, 40, 60 and 80 min) and three extraction times (15, 30 and 45 min). After sampling, SPME fibre was inserted into the GC and GC-MS injection ports for desorption of volatile components (5 min), both using the splitless injection mode. Before sampling, each fibre was reconditioned for 5 min in the GC injection port at 260°C. HS-SPME and subsequent analyses were performed in triplicate.

Component identification

The identification of the oil components was performed by their retention indices (RI), authentic reference compounds, peak matching library search, as well as published mass spectra^[11-14]. Retention indices were calculated using an *n*-alkane series (C7–C25) under the same GC conditions as for the samples. The relative amount (%) of individual components of the oil is expressed as percent peak area relative to total peak area from the GC/FID analyses of the whole extracts.

Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity of the samples was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging^[15]. In test tubes, 0.25 mL of DPPH 0.8 mM in MeOH was added to accurately weighed

aliquots of the extracts dissolved in 3.75 mL of MeOH, corresponding to concentration ranges of extract between 0.01 to 0.2 mg/mL. After mixing, the samples were maintained in the dark, at room temperature for 30 min. The absorbance at 517 nm was measured using a U.V/VIS Spectrophotometer (Optizen POP) and compared with a control without extract. A blank was prepared for each sample using methanol instead of the DPPH solution. Ascorbic acid was used as reference compound. Antioxidant activity was expressed as a percent inhibition of DPPH radical, and calculated from the equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100 \cdot \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}}$$

IC_{50} values were determined from the plotted graphs of scavenging activity against the concentration of the extracts. These values are defined as inhibitory concentration of the extract necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50% and are expressed in mg/mL. Triplicate measurements were carried out.

RESULTS AND DISCUSSION

The aerial parts of *M. spicata* yielded 1,27±0,02% (w/w) (calculated on a dry weight basis) of a pale-greenish oil. The components identified from *M. spicata* oil, their retention indices and their percentage composition are summarized in TABLE 1 where all the com-

TABLE 1 : Volatile compounds identified in *M. spicata* using HS-SPME and hydrodistillation.

N°	Compounds ^a	RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	HD	SPME	Identification ^e
1	3-methyl 1-Butanol	717	710	/	-	0.3	RI. MS. Ref.1
2	Hexanal	780	772	/	-	0.2	RI. MS. Ref.1
3	Heptanal	876	878	1187	tr	0.2	RI. MS
4	α -Thujene	922	924	1023	0.5	0.4	RI. MS
5	α - Pinene	931	932	/	-	2.6	RI. MS
6	6-methyl-3-Heptanone	935	937	1320	-	0.3	RI. MS. Ref.1
7	Camphene	943	945	1069	0.7	0.2	RI. MS
8	6-Methylhept-5-en-2-one	946	952	/	-	0.4	RI. MS
9	Sabinene	964	967	1122	-	1.6	RI. MS
10	β -pinene	970	972	1112	1.0	1.0	RI. MS
11	3-Octanol	986	981	1387	1.4	3.4	RI. MS
12	Myrcene	979	981	1160	0.9	0.5	RI. MS
13	3-methyl butylisobutyrate	994	994	/	-	0.5	RI. MS. Ref.1
14	α -Phellandrene	997	1006	/	-	0.3	RI. MS
15	α -Terpinene	1008	1011	1180	-	1.5	RI. MS
16	<i>p</i> -Cymene	1011	1014	1268	0.1	-	RI. MS
17	Eucalyptol	1020	1025	1203	17.6	55.1	RI. MS

N°	Compounds ^a	RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	HD	SPME	Identification ^e
18	(Z)-β-Ocimene	1024	1027	1231	0.4	0.3	RI. MS
19	(E)-β-Ocimene	1034	1038	1239	0.2	-	RI. MS
20	γ-Terpinene	1047	1050	1244	0.3	0.7	RI. MS
21	trans-hydrate Sabinene	1051	1055	1457	1.5	0.8	RI. MS
22	Terpinolene	1078	1081	1282	0.1	0.3	RI. MS
23	Nonanal	1083	1084	1374	0.1	tr	RI. MS
24	Linalol	1081	1084	1554	0.1	-	RI. MS
25	3-octyl Acetate	1111	1110	1332	0.2	tr	RI. MS
26	Limonene-1,2-epoxyde-Z	1117	1117	/	-	0.1	RI. MS
27	(Z)-Linalol-oxide	1148	1143	/	-	0.2	RI. MS
28	Borneol	1148	1151	1687	0.2	0.1	RI. MS
29	Terpinene-4-ol	1161	1164	1598	0.9	2.5	RI. MS
30	(Z)-dehydro-Carvone	1173	1173	1616	1.3	4.3	RI. MS
31	α-Terpineol	1176	1178	1699	0.5	0.1	RI. MS
32	Neoiso-dehydro-Carveol	1178	1180	1743	11,7	3.5	RI. MS
33	cis-Carveol	1208	1206	1822	-	3.9	RI. MS
34	Carvone	1222	1223	1724	48.4	7.2	RI. MS
35	Pulegone	1222	1222	/	-	0.2	RI. MS
36	Carvotanacetone	1230	1224	/	-	0.7	RI. MS
37	Carvacrol	1282	1278	/	-	3.0	RI. MS
38	neodehydroCarvyleacetate	1311	1312	1665	1.1	tr	RI. MS
39	(E)-Jasmone	1364	1369	1889	0.3	0.2	RI. MS
40	β-Bourbonene	1385	1384	1511	1.2	0.2	RI. MS
41	β-Elemene	1388	1389	1587	0.8	-	RI. MS
42	(E)-β-Caryophyllene	1424	1419	1593	2.1	0.2	RI. MS
43	Germacrene D	1480	1477	1706	1.1	-	RI. MS
44	bicycle-Germacrene	1494	1491	1718	0.3	-	RI. MS
45	β-Bisabolene	1500	1500	1729	tr	-	RI. MS
46	Trans-Calamenene	1512	1510	1810	0.1	-	RI. MS
47	δ-Cadinene	1516	1515	1752	tr	-	RI. MS
48	α-Cadinene	1536	1531	1736	tr	-	RI. MS
49	τ-Cadinol	1632	1638	2195	0.2	-	RI. MS
	Total (%)				95.3	97.0	
	Hydrocarbon compounds				9.8	10.2	
	Oxygenated compounds				85.5	87.2	
	Hydrocarbon monoterpenes				4.2	9.4	
	Hydrocarbon sesquiterpenes				5.6	0.4	
	Oxygenated monoterpenes				83.6	81.9	
	Oxygenated sesquiterpenes				0.2	-	
	Aliphatic compounds				1.7	5.3	

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1), ^b Retention indices of literature on the apolar column (RI_a) reported from König et al., 2001, ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI_a), ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p), ^e RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; Ref1,: compounds identified from literature data König et al., 2001.

pounds are arranged in order of their elution on the RTX-1 column. The principal compounds (>1.0%)

Full Paper

appear in bold face. Two different columns, a polar (RTX-1) and a non-polar (RTX-Was), have been used in the GC-MS analysis to identify the majority of the components. An analysis of the essential oil of *M. spicata* harvested in west northern region of Algeria identified 37 components, which accounted for 95.3% of the total number. Their retention indices and relative percentages are shown in TABLE 1. Among these, 24 monoterpenes, 10 sesquiterpenes and 4 aliphatic compounds were identified. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC-retention indices with those of our laboratory-produced "Arômes" library, with the exception of four components that were identified by comparison with spectral data and retention indices from the literature. The oil extracted by hydrodistillation was characterized by a large amount of monoterpenes (87.8%) made up of oxygenated monoterpenes (83.6%) and hydrocarbon monoterpenes (4.2%). Hydrocarbon compounds represented only 10.28% of the oil, most of them being oxygenated (32.7%). The principal compounds were found to be carvone (48.42%), eucalyptol (17.6%) and neoisodehydrocarveol acetate (11.7%). Other representative compounds were identified as (E)- β -Caryophyllene (2.1%), trans-hydrate sabinene (1.5%), 3-Octanol (1.4%), (Z)-dehydrocarvone (1.3%), β -bourbonene (1.2%), neo isodehydrocarvyle acetate (1.1%), germacrene D (1.1%) and β -pinene (1.0%) were minor constituents of the oil.

The oil vapour adsorbed by headspace SPME showed higher amounts of monoterpenes (91.3%) than sesquiterpenes (0.4%). As in the hydrodistilled oil, oxygenated monoterpenes (81.9%) were found in higher amounts than the hydrocarbons (9.4%). However, sesquiterpenes are represented only by hydrocarbon sesquiterpenes (0.4%). Other characteristic compounds of the oil were identified as cis-carveol (3.9%), car-

vacrol (3.0%), α -pinene (2.6%), terpinene-4-ol (2.5%), sabinene (1.6%) and α -terpinene (1.5%). Quantitative but not qualitative differences have been found in the chemical composition of both analysed samples depending of the extraction method. Carvone (7.2-48.4%) was found as the principal component of this species but it was found in greater concentrations in the essential oil than in the SPME extracts. Inversely, eucalyptol (17.6-55.1%) was found in greater concentrations in the SPME extracts than in the hydrodistillation ones. The chemical differences observed between both the essential oils and the volatile fractions extracted using HD and SPME, respectively, can be explained by the fact that the first technique is based on the liquid quasitotal extraction of plant volatiles and the latter technique is controlled by a solid/gas equilibrium step. During hydrodistillation, the most volatile compounds and water-soluble compounds are lost in the gaseous phase and in the hydrolate, respectively, whereas, with HS extraction, it is the fiber affinity of each compound that monitors the sampling of the volatiles. As a consequence, it should be noted that 11 compounds (1, 2, 5, 8, 1, 14, 26, 27, 35, 36 and 37) were identified only in the volatile fractions extracted using HS-SPME. As stated above the oil from *M. spicata* is characterized by high amount of eucalyptol. This compound does not usually appear as dominant in oils of other *Mentha* species.

Radical scavenging activity

DPPH method has been widely used in the determination of the antiradical activity of single compound as well as different plant essential oils. This method is based on the reduction of alcoholic DPPH solutions in the presence of a hydrogen donating antioxidant. The method was used to evaluate the antioxidant properties of the *M. spicata* in comparison with the synthetic antioxidant (ascorbic acid). As shown in TABLE 2, this

TABLE 2 : Antioxidant activity of essential oil of *M. spicata* using DPPH testing method.

Sample	Antioxidant activity				
Oil	Extract concentration (mg/mL)	0.2	4.2	6.3	12.6
	Scavenging effect on DPPH (%)	16.32	32.72	42.64	52.21
	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)				10.62
Ascorbic acid	Extract concentration (mg/mL)	0.04	0.05	0.06	0.08
	Scavenging effect on DPPH (%)	39.40	51.03	68.57	97.84
	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)				0.048

essential oil showed concentration-dependant antiradical activities. These results show a percent of inhibition of 52.21% in the presence of 12.6 mg/mL. The antioxidant activity of the essential oil can be also evaluated by the determination of the IC_{50} values corresponding to the amount of extract required to scavenge 50% of DPPH radicals present in the reaction mixture. High IC_{50} values indicate low antioxidant activity. Assessed sample was able to reduce the stable violet DPPH radical to the yellow DPPH, reaching 50% of reduction with IC_{50} value of 10.62 mg/mL. This IC_{50} values was less than the IC_{50} obtained for ascorbic acid (0.048 mg/mL) used as positive control. In addition, the antioxidant activity of our essential oil is probably due to the presence of great amount of oxygenated compounds (85.5%).

CONCLUSIONS

In this work, we were able to show that the chemical composition of *M. spicata* essential oil from west-Northern of Algeria is dominated by carvone (7.2–48.4%) and eucalyptol (17.6–55.1%). So, this study demonstrates that HD and HS-SPME modes could be complimentary extraction techniques in order to obtain the complete characterization of plant volatiles. Other hand, essential oil showed moderate antioxidant activity.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Professor Noury BENABADJI of the Botanical Laboratory, Biology Department, Abou Bekr Belkaïd University for the identification of the vegetable matter.

REFERENCES

- [1] H.J.Dorman, M.Kosar, K.Kahlos, Y.Holm, R.Hiltunen; *J.Agric.Food Chem.*, **51**, 4563 (2003).
 [2] S.P.S.Khanuja; *Employ contract farming to boost*

- area under cultivation for essential oil bearing crops. In *Business enabling of aromatic plants and products*, 21e22 November 2007 at HRDI Dehradun. *Chemical weekly*, 25 December, 180e184 (2007).
 [3] L.Jirovetz, G.Buchbauer, M.Shabi, M.B.Ngassoum; *Perfum.Flav.*, **27**, 16 (2002).
 [4] Y.M.Yonis, S.M.Beshir; *J.Essent.Oil Res.*, **16**, 539 (2004).
 [5] B.M.Lawrence; *Mint: The Genus Mentha*. CRC Press, Boca Raton, FL, (2006).
 [6] R.Karousou, M.Balta, E.Hanlidou, L.Kokkini; *Mints, smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries*. *J.Ethnopharmacol.*, **109**, 248 (2007).
 [7] D.Zhao, Y.Wen Xu, Guo.Li Yang, M.Amjad, Wei Wu.Husaini; *Ind.Crop.Prod.*, **42**, 251 (2013).
 [8] A.Orav, A.Raal, E.Arak; *Proc.Est.Acad.Sci.Chem.*, **53**, 174 (2004).
 [9] G.Kofidis, A.Bosabalidis, S.Kokkini; *J.Essent.Oil Res.*, **16**, 469 (2004).
 [10] H.Kataoka, H.L.Lord, J.Pawliszyn; *Journal of Chromatography A.*, **880**, 35 (2000).
 [11] *Arômes library of Laboratory of Chemistry of Natural Products*. University of Corse, Corte, France. UMR CNRS 6134, (1987–2011).
 [12] W.A.König, D.H.Hochmuth, D.Joulain; *Terpenoids and related constituents of essential oils*. Library of Mass Finder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, (2001).
 [13] R.P.Adams; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, (2007).
 [14] NIST/EPA/NIH, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, Version 2.1. Perkin Elmer Instrument LLC, Copyright, (2000).
 [15] O.P.Sharma, T.K.Bhat; *Food Chem.*, **113**(4), 1202 (2009).



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd



Document heading

doi:10.1016/S2222-1808(14)60323-6

© 2014 by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved.

Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria

Nadia Fekih¹, Hocine Allali^{1*}, Salima Merghache¹, Faïza Chaïb¹, Djamila Merghache³, Mohamed El Amine¹, Nassim Djabou¹, Alain Muselli², Boufeldja Tabti¹, Jean Costa²

¹University of Tlemcen, Laboratory of Natural and Bioactive Products (LASNABIO), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

²University of Corsica, UMR CNRS 6134, Laboratory of Natural Products Chemistry, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France

³University of Tlemcen, Laboratory of Physical Chemistry of Antibiotics and Antifungals, Synthesis and Biological Activities, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Ramdani Mohammed, Professor,
University of Mohamed Ier Oujda – Bd
Med VI B.P. 717 Oujda 60000, Morocco.
Tel: +212-7688-9949
Fax: +212-3650-0603
E-mail: moharamdani2000@yahoo.fr

Comments

Essential oils from *P. halepensis* growing in Algeria have been reported to have various therapeutic properties. They are also used as fragrances in cosmetics, flavoring additives for food and beverages. In this study, we provide evidence of its main antimicrobial activity.

Details on Page 102

ABSTRACT

Objective: To find new bioactive natural products, the chemical composition and to study the antibacterial activity of essential oil components extracted from the aerial parts of the Algerian aromatic plant *Pinus halepensis* Miller (*P. halepensis*) (needles, twigs and buds).

Methods: The essential oil used in this study was isolated by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia. The chemical composition was investigated using GC-retention indices (*RI*) and GC-MS.

Results: Forty-nine compounds, representing 97.9% of the total collective oil, were identified. Essential oil was dominated by hydrocarbon compounds (80.6%) especially monoterpenes (65.5%). The major compounds from ten oils stations were: myrcene (15.2%–32.0%), α -pinene (12.2%–24.5%), E- β -caryophyllene (7.0%–17.1%), terpinolene (1.8%–13.3%), 2-phenyl ethyl isovalerate (4.8%–10.9%), terpinene-4-ol (1.0%–8.2%) and sabinene (1.5%–6.3%). The intra-species variations of the chemical compositions of *P. halepensis* aerial parts essential oils from ten Algerian sample locations were investigated using statistical analysis. Essential oil samples were clustered in 2 groups by hierarchical cluster analysis, according to their chemical composition. The essential oil revealed an interesting antimicrobial effect against *Lysteria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae*.

Conclusions: These results suggest that the essential oil from *P. halepensis* may be a new potential source as natural antimicrobial applied in pharmaceutical and food industries.

KEYWORDS

Pinus halepensis Miller, Essential oils, GC/MS, Chemical variability, Antimicrobial activity

1. Introduction

The genus *Pinus* belongs to the family Pinaceae and comprises about 250 species. It is the largest genus of conifers occurring naturally in the northern hemisphere, especially in the Mediterranean region, Caribbean area, Asia, Europe, North and Central American. The genus *Pinus* has been planted

in the temperate regions of the southern hemisphere. They are evergreen and resinous trees growing to 3–80 m tall with needle-like gray-green leaves that grow in pairs [1–3].

The medicinal and aromatic properties of the chemical compounds (e.g., turpentine, resins and essential oil....) of pine make it one of the most popular plants throughout all civilization. Pine is also still widely used in traditional

*Corresponding author: Hocine Allali, University of Tlemcen, Laboratory of Natural and Bioactive Products (LASNABIO), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria.

Tel/Fax: (+213) 43.28.65.30

E-mail: h_allali72@yahoo.fr

Foundation Project: Supported by the University of Tlemcen and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the Algerian People's Democratic Republic for the granting of financial assistance under the project CNEPRU (Ref. E02020100067/2011–2013).

Article history:

Received 11 Oct 2013

Received in revised form 20 Oct, 2nd revised form 28 Oct, 3rd revised form 14 Nov 2013

Accepted 21 Feb 2014

Available online 28 Apr 2014

therapeutic practice in world and has economic importance[4,5]. In the Northern Mediterranean basin, *Pinus halepensis* Miller (*P. halepensis*) is a pioneer and expansionist species that colonizes abandoned agricultural lands characterized by high biodiversity. Owing to its richness of secondary metabolites, *P. halepensis* may play an important role in plant succession through several processes. For example, secondary compounds (terpenoids and/or phenolic compounds) can affect root symbionts and site quality, by interfering with decomposition, mineralization, and humification[6,7]. *P. halepensis* may inhibit seedling establishment of various species in pine stands, suggesting the allelopathic nature of litter, leaf leachates, and/or root exudates[8,9].

P. halepensis seeds are traditionally used throughout Tunisia and other Arabic countries, for preparing a sweet pudding of group pine seeds, called “Assida–Zgougou”. Recently, it has been employed as an ingredient in ice–creams and candies[10]. Essential oils from *Pinus* species have been reported to have various therapeutic properties. They are also used as fragrances in cosmetics, flavoring additives for food and beverages, scenting agents in a variety of household products and intermediates in the synthesis of perfume chemicals[1,2,4,11]. Several phytochemical analyses of *P. halepensis* have been published on terpenes[12,13], turpentine[14] and phenolic compounds[15]. The literature reports some works on the chemical composition of *P. halepensis* essential oil from Italy[6,16], Algeria[5,17–19], Greece[20], Morocco[21] and Turkey[22,23]. Various compositions have been reported.

The first aim of this study was to elucidate the composition of *P. halepensis* essential oil using a combination of GC and GC/MS. The second aim was to characterize the intra–species variation in essential oil composition in natural populations using 10 oil samples from different locations of Algeria and to evaluate the antibacterial activity of essential oil.

2. Materials and methods

2.1. Plant Material

The aerial parts of *P. halepensis* (needles, twigs and buds) were collected in January 2012 from 10 locations from Tlemcen. The plant material was botanically identified by Prof. Noury Benabadji (Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of University of Tlemcen, Algeria). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen. Each fresh aerial part (400–500 g) was submitted to hydrodistillation for 5 h using a Clevenger–type apparatus according to the European Pharmacopoeia[24].

2.2. GC analysis

GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and two fused–silica capillary columns (60 m×0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx–1 (polydimethylsiloxane) and Rtx–Wax (polyethylenglycol). The oven temperature was programmed from 60 °C to 230 °C at 2 °C/min and then held isothermally at 230 °C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280 °C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL/

min); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (*RI*) of the compounds were determined from a software from Perkin–Elmer. Component relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors.

2.3. GC–MS analysis

Samples were analyzed with a Perkin–Elmer Turbo mass detector (quadrupole), coupled to a Perkin–Elmer Autosystem XL, equipped with the fused–silica capillary columns Rtx–1 and Rtx–Wax (ion source temperature 150 °C; energy ionization 70 eV). EI mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1 second). Other GC conditions were the same as described under GC except split 1/80.

2.4. Component identification

Identification of the components was based (i) on the comparison of their GC retention indices (*RI*) on non polar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of *n*–alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data[25,26] and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries[27–29] and comparison of spectra with those of our laboratory–made library.

2.5. Statistical analysis

Data analyses were performed using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA)[30]. Both methods aim at reducing the multivariate space in which objects (oil samples) are distributed but are complementary in their ability to present results[31]. Indeed, PCA provides the data for diagrams in which both objects (oil samples) and variables (oil components) are plotted while canonical analysis informs a classification tree in which objects (sample locations) are gathered. PCA was carried out using function ‘PCA’ from the statistical R software.

The variables (volatile components) have been selected using function from the statistical software. The cluster analysis produced a dendrogram (tree) using the Ward’s method of hierarchical clustering, based on the Euclidean distance between pairs of oil samples.

2.6. Antimicrobial activity

2.6.1. Test microorganisms

Antibacterial activity of *P. halepensis* essential oil was tested against 11 strains of bacteria: Gram–positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*S. aureus*), *Bacillus cereus* ATCC 10876 (*B. cereus*), *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 (*E. faecalis*), *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (*L. monocytogenes*) and Gram–negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (*K. pneumoniae*). The microorganisms were obtained from Pasteur Institute of Paris.

2.6.2. Paper–disc diffusion method

Antibacterial activity was tested by the agar–well diffusion

method[32,33]. All bacterial cultures were first grown on MHI agar (Muller–Hinton infusion) plates at 37 °C for 18–24 h prior to inoculation onto the nutrient agar. One or several colonies of similar morphology of the respective bacteria were transferred into API suspension medium (Biomérieux) and adjusted to 0.5 McFarland turbidity standard with a Densimat (Biomérieux). The inoculum of the respective bacteria were streaked onto MHI agar plates using a sterile swab. A sterile filter disc (diameter 6 mm, Whatman paper No.3) was placed. The disc was impregnated by the tested essential oils (10 µL/disc). The treated Petri dishes were placed at 4 °C for 1–2 h and then incubated at 37 °C for 24 h. Antibacterial activity was evaluated by measuring the zone of growth inhibition around the discs after 24 h of incubation at 37 °C. The diameter of the zones of inhibition around each of the discs was taken as measure of the antibacterial activity. Each experiment was carried out in triplicate and the mean diameter of the inhibition zone was recorded. The scale of measurement was as follows[34] (disc diameter included): ≥ 8 mm: good activity; 7.5–7.9 mm: average activity; 7–7.4 mm: moderate activity; 6.5–6.9 mm: low activity; ≤ 6.4 mm: no activity.

3. Results

3.1. Sample location and oil yields

We regrouped in Table 1 the major components of *P. halepensis* essential oils reported in literature. Various compositions have been reported, characterized by the occurrence of monoterpenes, sesquiterpenes and phenylpropanoids compounds.

Table 1

Main components of the essential oils of *P. halepensis* from different origins previously reported.

Plant origin	Algeria[5,17–19]					Greece[20]	Italy[6,16]	Morocco[21]	Turkey[22,23]			
	Chazaouet	Saïda	Sidi Feradj	Tissemsilt	Djelfa				HD	HD	HD	HD
Extraction modes	HD	HD	HD	HD	HD	HD	HD	HD	HD	HD	HD	HD
No Compounds	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
2 α–Pinene	nd	6.4	1.2	6.7	17.6	13.4	18.1	8.5	23.3	47.1	18.4	16.4
4 Sabinene	nd	0.7	1.2	7	2.6	1.3	9.4	6.1	3.7	nd	0.1	0.6
5 β–Pinene	nd	5.6	0.2	2.0	1.6	1.1	2.0	1.1	3.1	2.8	46.8	18.7
6 Myrcene	nd	0.5	3.1	8.7	3.2	6.6	27.9	12.5	16.3	6.3	1.3	3.8
8 3–Carene	nd	0.4	0.2	0.1	1.9	6.9	1.7	1	nd	1.7	0.9	16.3
10 p–Cymene	nd	nd	nd	0.3	3	nd	1.1	11.4	0.7	0.4	tr	0.1
12 Limonene	nd	0.1	tr	0.8	0.1	5.0	1.1	1	1.3	0.8	2.3	18.7
16 Terpinolene	nd	2.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.3	1.8
21 Terpinen–4–ol	0.4	0.6	tr	nd	0.6	0.7	nd	nd	3.8	nd	nd	nd
22 α–Terpinolene	nd	nd	0.1	0.2	tr	3.1	9.9	nd	10.1	1	nd	nd
28 E–β–Caryophyllene	3	nd	nd	7.1	2.7	nd	nd	nd	nd	11.2	9.2	9.5
29 α–Humulene	0.74	10.5	7.9	2.8	1.4	3.4	2.9	nd	3.2	2.7	1.8	1.8
30 2–Phenylethyl isovalerate	nd	nd	nd	7.4	8.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
31 Germacrene D	nd	0.8	0.5	0.2	tr	0.5	0.1	nd	nd	tr	8.8	1.5
37 Caryophyllene oxide	48.2	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	1.2	7.8	0.4	0.4
44 Bulnesol	nd	nd	nd	nd	nd	7.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Z–β–Caryophyllene	nd	25	40.31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Aromadendrene	nd	5.4	7.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Humulene oxide	6.7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Thumbergol	8.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Only the main components were reported; main components are classed by number corresponding to the Table 1; only one sample was studied. Extraction mode: HD: Hydrodistillation; tr: trace (<0.05%); nd: compounds not detected.

In our study, the aerial parts of *P. halepensis* were collected from 10 locations in West Northern of Algeria. Some information concerning the 10 harvest areas (origins, latitudes, longitudes and essential oil yield) were tabulated in Table 2.

Table 2

Essential oils yields, origins, latitudes and longitudes of ten Algerian *P. halepensis*.

Areas	Samples	Regions	Latitudes	Longitudes	Altitudes	Essential oil yields (%)	
Littoral	S1	Nedroma	34° 52' 38"	1°14' 25"	650 m	0.14	
	S2	Hwanet	34° 58' 13"	1°48' 10"	650 m	0.20	
	S3	Oued Tlala	35° 03' 51"	1°44' 59"	197 m	0.40	
	Area 1	S4	Bab Taza	34° 58' 13"	1° 45' 16"	662 m	0.22
		S5	Bab El Assa	34° 58' 08"	2° 01' 40"	537 m	0.63
		S6	Sidi youchaa	35° 06' 55"	1° 46' 47"	111 m	0.30
	S10	Ghazaouet	35° 05' 59"	1° 50' 59"	118 m	0.40	
Mountain	Area 2	S7	Agadir	34° 53' 21"	1° 18' 06"	914 m	0.13
		S8	Amieur	35° 01' 59"	1° 15' 20"	706 m	0.14
		S9	Mansourah	34° 52' 27"	1° 19' 11"	983 m	0.35

The sample locations were distributed in two areas. Area 1 was considered as littoral zone near to the Mediterranean Sea, while area 2 was a Mountain zone with altitudes up to 700 m. Area 2 has a warm and sub–humid climate while the soil of area 1 is red fersiallitic with vertic character. The yield of essential oils obtained from fresh aerial part in the ten locations of *P. halepensis* ranged from 0.13% to 0.63% and more precisely it is noticeable that higher yields (0.20% to 0.63%) were linked to sample oils from area 1 while lower yields (0.13% to 0.35%) were linked to sample oils from area 2 (Table 2). Volatile oil yield of *P. halepensis* in different parts from Algeria had similar results. Values of 0.3%, 0.52%, 0.8% and 0.9% (in dry weight basis) were found in the Ghazaouet, Saïda, Djelfa and Sidi Fredj, respectively[5,17–19].

3.2. Chemical analysis of *P. halepensis* essential oils

Chemical composition of *P. halepensis* oils from 10 samples were studied using GC and GC/MS (Table 3). Forty nine compounds, which accounted for 97.9% of oil, were isolated.

Table 3

Chemical composition of *P. halepensis* essential oils from West Northern of Algeria.

Compounds	IR ^a LIT	IR ^b app	IR ^c pol	Collective Oil ^d		Simple Oils ^e		Identification
				%	%Min	%Max	%Min	
α-Thujene	922	923	1021	0.7	0.4	1.0		RI, MS
α-Pinene	931	932	1023	16.8	12.2	24.5		RI, MS
Camphene	943	944	1066	0.2	0.1	0.3		RI, MS
Sabinene	964	966	1118	4.2	1.5	6.3		RI, MS
β-Pinene	970	971	1108	1.9	1.7	2.2		RI, MS
Myrcene	970	983	1159	25.2	15.2	32.0		RI, MS
α-Phelandrene	997	998	1157	0.1	nd	0.2		RI, MS
3-Carene	1005	1006	1147	1.6	0.6	5.5		RI, MS
α-Terpinene	1008	1010	1175	0.9	0.1	1.8		RI, MS
p-Cymene	1010	1012	1259	0.6	0.2	1.8		RI, MS
β-Phelandrene	1021	1021	1204	0.4	0.7	1.4		RI, MS
Limonene	1020	1021	1195	0.9	0.6	1.4		RI, MS
Z-β-Ocimene	1024	1025	1225	0.4	nd	1.4		RI, MS
E-β-ocimene	1034	1036	1241	1.4	0.52	3.4		RI, MS
γ-Terpinene	1047	1049	1237	1.4	0.2	2.6		RI, MS
Terpinolene	1078	1082	1247	8.3	1.8	13.8		RI, MS
Linalool	1080	1084	1529	0.4	0.1	0.8		RI, MS
Perillene	1090	1099	1414	0.1	tr	0.1		RI, MS
Cis-p-menth-2-en-1-ol	1108	1107	1600	0.2	0.1	0.3		RI, MS
Trans-p-menth-2-en-1-ol	1113	1117	1612	0.1	tr	0.2		RI, MS
Terpinene-4-ol	1161	1164	1583	4.2	1.0	8.2		RI, MS
α-Terpinolene	1179	1175	1688	0.4	tr	0.7		RI, MS
Bomyl acetate	1269	1268	1475	0.1	tr	0.3		RI, MS
Citronellyl acetate	1331	1333	1645	0.1	tr	0.1		RI, MS
Neryl acetate	1342	1342	1409	0.1	0.1	0.2		RI, MS
Geranyl acetate	1361	1360	1740	0.2	tr	0.5		RI, MS
α-Copaene	1379	1373	1475	0.2	0.1	0.3		RI, MS
E-β-Caryophyllene	1424	1418	1583	10.9	7.0	17.1		RI, MS
α-Humulene	1456	1449	1651	2.1	1.3	3.4		RI, MS
2-Phenylethyl isovanerate	1463	1468	1973	7.7	4.8	10.9		RI, MS
Germacrene D	1480	1474	1692	0.2	0.1	0.2		RI, MS
α-murolene	1496	1492	1709	0.2	tr	0.6		RI, MS
δ-Cadinene	1516	1513	1738	0.3	tr	0.5		RI, MS
E-α-Bisabolene	1532	1532	1740	0.2	0.1	0.3		RI, MS
Phenylethyl Tiglate E	1547	1546	2141	0.1	nd	0.2		RI, MS
Phenylethyl Tiglate Z	1559	1568	2145	0.8	tr	3.3		RI, MS
Caryophyllene oxide	1576	1583	1898	0.8	0.2	2.2		RI, MS
Guaïol	1591	1592	2070	0.2	0.1	0.5		RI, MS
Humulene epoxyde	1601	1613	2035	0.1	tr	0.1		RI, MS
Epi-Cubenol	1624	1625	2043	0.1	0.1	0.2		RI, MS
Tau-Cadinol	1632	1633	2163	0.2	tr	0.1		RI, MS
T-Murolol	1634	1638	2141	0.1	0.1	0.3		RI, MS
α-Cadinol	1645	1640	2163	0.2	tr	0.3		RI, MS
Bulnesol	1659	1666	2195	0.1	nd	0.1		RI, MS
Cembrene	1938	1940	2185	0.4	0.1	1.6		RI, MS, Ref.
m-Camphorene	1947	1939	2234	0.2	nd	0.4		RI, MS, Ref.
Cembrene A	1962	1951	2227	0.1	nd	0.3		RI, MS, Ref.
p-Camphorene	1980	1974	1987	0.3	nd	1.1		RI, MS, Ref.
Geranyl Linalool	2037	2037	2540	1.5	nd	3.0		RI, MS
Total Identification %								97.9
Yields % (w/w)					0.26	0.10	0.63	
Hydrocarbon compounds								80.6
Monoterpene hydrocarbons								65.5
Sesquiterpene hydrocarbons								14.1
diterpenic hydrocarbons								1.0
Oxygenated compounds								17.3
Oxygenated monoterpenes								5.4
Oxygenated sesquiterpenes								1.8
Oxygenated diterpenes								1.5
Non-terpenic oxygenated compounds								8.6

^a: Retention indices of literature on the apolar column (*RI_{lit}*) reported from König et al., 2001; ^b: Retention indices on the apolar Rtx-1 column; ^c: Retention indices on the polar Rtx-Wax column; ^d: Normalized percentages abundance are given on the apolar column except for compounds with identical *RI* (percentages are given on the polar column), tr=trace (<0.05%). ^e: Minimum and maximum normalized percentages abundance from simple oils; *RI*: Retention indices; *MS*: Mass spectra in electronic impact mode; *Ref.*: compounds identified from literature data: König et al., 2001).

3.3. Chemical variation of *P. halepensis* essential oils

To identify possible relationships between volatile compound abundances and geographical origins, PCA and CA were applied to a matrix linking essential oil compositions to sample locations. The data mentioned in Table 4 and presented in Figures 1 and 2 were obtained from the correlation matrix and the standardized matrix.

Table 4

Clustering of *P. halepensis* oils samples by statistical analysis.

Components	Group I (S2–S6, S10)		Group II (S1–S7–9)	
	Range ^b	Average ^b	Range ^b	Average ^b
Monoterpene hydrocarbons	54.39		54.55	
α-Pinene	12.2–14.4	13.4	18.0–24.5	21.8
Sabinene	3.5–6.3	5.52	1.5–3.0	2.20
Myrcene	15.2–28.5	23.94	24.1–32.0	27.15
Terpinolene	9.4–13.8	11.53	1.8–5.8	3.42
Oxygenated monoterpenes	5.78		1.85	
Terpinene-4-ol	3.9–8.2	5.78	1.0–2.5	1.85
Monoterpene sesquiterpenes	8.78			
E-β-Caryophyllene	7.0–11.1	8.78	11.0–17.1	14.15
Non-terpenic compounds	10.1		5.76	
2-Phenylethyl isovanerate	8.7–10.9	10.1	4.8–7.0	5.76

^b Normalized % abundances.

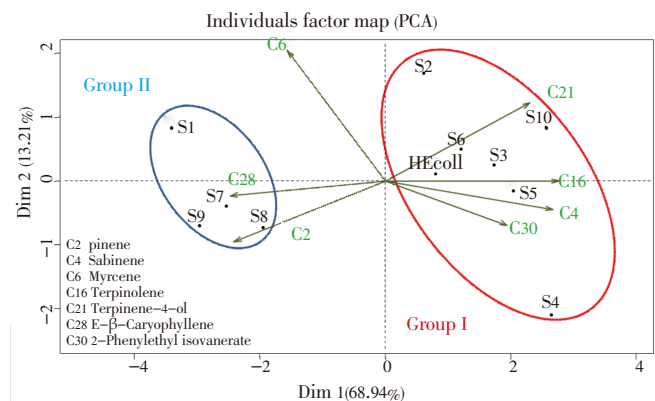


Figure 1. PCA of chemical compositions of *P. halepensis* oils from Algeria.

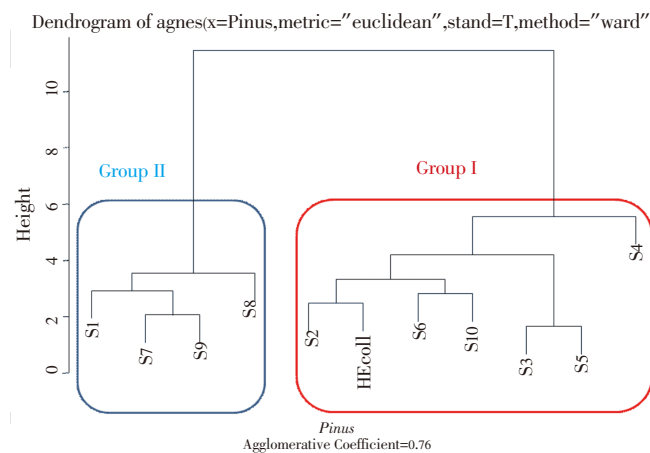


Figure 2. Cluster Analysis of chemical compositions of *P. halepensis* from Algeria.

3.4. Antimicrobial activity

The antibacterial activity of *P. halepensis* essential oil originating from the West Northern of Algeria was evaluated by paper disc diffusion method against 11 bacteria. Table 5 showed that oil has a variable antibacterial activity (8–10 mm) against tested strains. The maximum zone of inhibition was recorded against *L. monocytogenes* (10 mm), *K. pneumoniae* (10 mm), *E. faecalis* (9 mm) and *Acinetobacter baumannii* (9.5 mm). Other hand, the oil was ineffective against *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* and *Proteus mirabilis*. According to Sheng–Hsien^[34], the essential oil of *P. halepensis* showed good inhibitory effects on some tested microorganisms.

Table 5

Antibacterial activity of *P. halepensis* essential oils from the West Northern of Algeria.

Microorganisms	Diameters of inhibition (mm)
Gram-positive bacteria	
<i>S. aureus</i>	n.a
<i>B. cereus</i>	n.a
<i>E. faecalis</i>	9.0
<i>L. monocytogenes</i>	10.0
Gram-negative bacteria	
<i>P. aeruginosa</i>	8.0
<i>E. coli</i>	n.a
<i>Salmonella typhimurium</i>	n.a
<i>Acinetobacter baumannii</i>	9.5
<i>Citrobacter freundii</i>	8.0
<i>Proteus mirabilis</i>	n.a
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.0

Essential oil (10 μ L/disc) of aerial part of *P. halepensis*; n.a: not active.

4. Discussion

The chromatographic profile of essential oil from *P. halepensis* showed that oils are constituted of 26 monoterpenes, 16 sesquiterpenes, 4 diterpenes and 3 non-terpenic compounds. The oils are mainly composed by hydrocarbon compounds that accounted for 80.6%. The main components were myrcene (25.2%), α -pinene (16.8%), E- β -caryophyllene (10.9%) and terpinolene (8.3%). However, the oxygenated compounds have the lowest percentage (17.3%), most of them being non-terpenic (8.6%) and monoterpenes oxygenated (5.4%) represented by 2-phenylethyl isovanerate (7.7%) and terpinene-4-ol (4.2%). From a chemotaxonomic viewpoint, it should be noted that *P. halepensis* essential oils are qualitatively similar to those of literature but differ in the amounts of the major components. Indeed, several reports on the composition of oils of other *Pinus* species revealed that monoterpene hydrocarbons were the major constituent in the most of the oils; they often constituted 50% or more of the oil^[6,21].

Although the 10 essential oils contained similar types of compounds, there were significant differences in the concentrations of the major components. For instance, the concentrations of α -pinene (C2), sabinene (C4), myrcene (C6), terpinolene (C16), terpinene-4-ol (C21), E- β -caryophyllene (C28) and 2-phenylethyl isovanerate (C30) ranged from 12.2% to 24.5% of oil, from 15.2% to 32.0% of oil, from 1.8% to 13.8% of oil, from 1.0% to 8.2% of oil, from 7.0% to 17.1% of oil and from 4.8% to 10.9% of oil, respectively. The principal factorial plane accounts for 93.56% of the chemical essential oils variance. The F1 axis (68.94%) are positively correlated with oxygenated sesquiterpenes (C4, C16, C21 and C30) and negatively correlated with E- β -caryophyllene (C28) and 2-phenylethyl isovanerate (C30). The plot established using the first two axes suggests that there are two main groups of *P. halepensis* oils. The first group (I) includes oil samples from 6 localities (S2–S6, S10), characterized by more high levels of myrcene C6 (15.2–28.5% of oil), terpinolene C16 (9.4%–13.8% of oil), 2-phenylethyl isovanerate C30 (8.7%–10.9% of oil), sabinene C4 (3.5%–6.3% of oil) and terpinene-4-ol C21 (3.9%–8.2% of oil). The group II includes 4 oil samples (S1, S7–9) was characterized by a high content of α -pinene C2 (18.0%–24.5% of oil), myrcene C6 (24.1%–32.0% of oil) and E- β -caryophyllene C28 (11.0%–17.1% of oil). However, statistical analysis clustered the essential oil samples into two distinct groups linked to the origin of harvest. Group I consisted of oils rich in α -pinene, myrcene, terpinolene and 2-phenylethyl isovanerate, originated from littoral zone (Area 1) and group II consisted of oils rich in α -pinene, myrcene and E- β -caryophyllene, originated from mountains of Tlemcen (Area 2). These results suggested that variation in the compositions of essential oils among populations can be attributed to the growing conditions and environmental factors.

The essential oils of *P. halepensis* showed good inhibitory effects on some tested microorganisms. It would be related to their oxygenated monoterpenes components which constitute more than 16.2% of the oil. The antibacterial activity of essential oil of *P. halepensis* from Ghazaouet (West Northern of Algeria) was evaluated against four strains of bacteria: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *B. cereus*, using disc diffusion method. The essential oil showed a strong activity against *S. aureus* and *B. cereus*. Contrary, the oil was ineffective against *P. aeruginosa* and *E. coli*^[35]. However, it is difficult to attribute the activity of a complex mixture to a single or particular constituent. Secondly there is some evidence that minor components have a critical part to play in antibacterial activity, possibly by producing a synergistic effect between other components^[36,37]. The variation in chemical composition of essential oil might be responsible for the different antibacterial activities.

In conclusion, the comparison of our results with literature shows considerable qualitative and quantitative difference

in yields and composition of *P. halepensis* oils. The variability in oil composition is present even in *P. halepensis* and these variations, sufficient to allow the distinction of different chemotypes, are the results of an adaptive process to particular ecologic conditions (geographical regions, climate conditions, altitude), period of collection of the plant, studied parts of plant, state of plant (fresh or dry) and method of extraction of the essential oil. Bioassay screening of oil showed an activity against *L. monocytogenes* and *K. pneumoniae*. The results of the current study have shown that essential oil of *P. halepensis* is potentially a good source of antimicrobial compounds.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are thankful to Professor Noury Benabadji of the Botanical Laboratory, Biology Department, Abou Bekr Belkaïd University for the identification of the vegetable matter. This study was supported by the University of Tlemcen and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the Algerian People's Democratic Republic for the granting of financial assistance under the project CNEPRU (Ref. E02020100067/2011–2013).

Comments

Background

Plant-derived essential oils have long served as flavoring agents in foods and beverages, and due to their versatile content of antimicrobial compounds, they possess potential as natural agents for food preservation. The antimicrobial activity of essential oils is assigned to a number of small terpenoid and phenolic compounds, which also in pure form have been shown to exhibit antibacterial activity. Essential oils are known to be active against a wide variety of microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria. This study was conducted to determine the antibacterial activity of *P. halepensis* essential oils against bacteria.

Research frontiers

The data obtained from the present experiments show a new application of essential oil from aerial parts of *P. halepensis* which is in agreement with its use in traditional medicine.

Related reports

In this present investigation, the authors have followed

standard protocols to assess the antimicrobial activity of essential oil from *P. halepensis* growing in Algeria. The results suggest that the essential oil from *P. halepensis* may be a new potential source as natural antimicrobial applied in pharmaceutical and food industries.

Innovations & breakthroughs

To my knowledge, there is no work for antimicrobial activity of essential oil from aerial parts of *P. halepensis* growing in West Northern of Algeria. The present report serves as the first hand information on the fact that this plant is potentially a good source of antimicrobial compounds.

Applications

There is strong interest in the use of naturally occurring compounds which have antibacterial activity for preservation of minimally processed foods. Plant essential oils are a potential source of antimicrobials of natural origin. Essential oils have been evaluated for their effects on the growth of food spoilage and foodborne pathogenic microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria. Possible use of essential oils as food preservatives has been studied.

Peer review

Essential oils from *P. halepensis* growing in Algeria have been reported to have various therapeutic properties. They are also used as fragrances in cosmetics, flavoring additives for food and beverages. In this study, the authors provide evidence of its main antimicrobial activity.

References

- [1] Fuentes JL, Vernhe M, Cuetava EB, Sanchez-Lamar A, Santana JL, Llagostera M. Tannins from barks of *Pinus caribaea* protect *Escherichia coli* cells against DNA damage induced by gamma-rays. *Fitoterapia* 2006; **77**(2): 116–120.
- [2] Kozan E, Kupeli E, Yesilda E. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their *in vivo* anthelmintic activity. *J Ethnopharmacol* 2006; **108**(2): 211–216.
- [3] Quézel P, Santa S. *New flora of Algeria and the Southern desert regions*, Volume I. Paris, France: CNRS; 1963, p. 39–40.
- [4] Baba Aïssa F. *Medicinal plants in Algeria. Identification, description of active ingredient properties and traditional use of common plants in Algeria*. Algiers: Bouchene and Ad. Diwan; 1991, p. 181.
- [5] Dob T, Berramdane T, Chelghoum C. Essential oil composition of *Pinus halepensis* Mill. from three different regions of Algeria. *J Essent Oil Res* 2007; **19**: 40–43.
- [6] Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Maccioni S, 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 Frag J* 2003; **18**: 139–143.

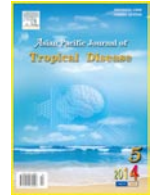
- [7] Kainulainen P, Holopainen JK. Concentrations of secondary compounds in Scots pine needles at different stages of decomposition. *Soil Biol Biochem* 2002; **34**: 37–42.
- [8] Fernandez C, Voiriot S, Mévy JP, Vila B, Ormeño E, Dupouyet S, et al. Regeneration failure of *Pinus halepensis* Mill.: the role of autotoxicity and some abiotic environmental parameters. *Forest Ecol Manag* 2008; **255**(7): 2928–2936.
- [9] Navarro-Cano JA, Barbera GG, Ruiz-Navarro A, Castillo VM. Pine plantation bands limit seedling recruitment of a perennial grass under semiarid conditions. *J Arid Environ* 2009; **73**(1): 120–126.
- [10] Cheikh-Rouhou S, Hentati B, Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Attia H. Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food Sci Tech Int* 2006; **12**(5): 407–415.
- [11] Kubeczka KH, Schultze W. Biology and chemistry of conifer oils. *Flavour Frag J* 1987; **2**: 137–148.
- [12] Asensio D, Owen SM, Llusia J, Penúelas J. The distribution of volatile isoprenoids in the soil horizons around *Pinus halepensis* trees. *Soil Biol Biochem* 2008; **40**: 2937–2947.
- [13] Ormeño E, Baldy V, Ballini C, Fernandez C. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: Effect of soil nutrients. *J Chem Ecol* 2008; **34**(9): 1219–1229.
- [14] Mirov NT, Iloff Jr PM. Composition of gum turpentine of pines. XXIII. A report on three mediterranean species: *Pinus pinea* (cultivated in California), *P. halepensis* (from Israel) and *P. brutia* (from Cyprus). *J Am Pharm Asso* 1955; **44**(3): 186–189.
- [15] Pasqualini V, Robles C, Garzino S, Greff S, Bousquet-Melou A, Bonin G. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* 2003; **52**(1): 239–248.
- [16] Vidrich V, Mechelozzi M, Fusi P, Heimler D. Essential oils of vegetables species of the Mediterranean and Alpine temperate climate areas. Grassi G, Delmon B, Molle JF, Zibetta H, editors. 4th EC Conference on Biomass for Energy and Industry; 1988.
- [17] Tazerouti F, Badjah-Hadj-Ahmed AY, Meklati BY, Favre-Bonvin J, Bobenrieth MJ. Analysis of essential oils from needles of *Pinus halepensis* Mill. by gas chromatography and mass spectrometry. *Plantes Medicinales et Phytotherapie* 1993; **26**(3): 161–176.
- [18] Dob T, Berramdane T, Chelghoum C. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie* 2005; **8**(11–12): 1939–1945.
- [19] Abi-Ayad M, Abi-Ayad FZ, Lazzouni HA, Rebiahi SA, Ziani-Cherif C, Bessiere JM. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *J Med Plant Res* 2011; **5**(22): 5433–5436.
- [20] Roussis V, Petrakis PV, Ortiz A, Mazomenos EB. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochem* 1995; **39**(2): 357–361.
- [21] Hmamouchi M, Hamamouchi J, Zouhdi M, Bessiere JM. Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan Pinaceae. *J Essent Oil Res* 2001; **13**(4): 298–302.
- [22] Tumen I, Hafizoglu Kilic A, Dönmez IE, Sivrikaya H, Reunanen M. Yields and constituents of essential oil from cones of *Pinaceae* spp. natively grown in Turkey. *Molecules* 2010; **15**: 5797–5806.
- [23] Ustun O, Sezer Senol F, Kurkcuoglu M, Erdogan Orhan I, Kartal M, Husnu Can Baser K. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Ind Corp Prod* 2012; **38**: 115–123.
- [24] Council of Europe. *European Pharmacopoeia*. 1st ed. Strasbourg: Council of Europe; 1997.
- [25] Jennings W, Shibamoto T. *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography*. New York: Academic Press; 1980.
- [26] König WA, Hochmuth DH, 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 [Assessed on 16 July, 2013].
- [27] Mc Lafferty FW, Stauffer DB. *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. New York: Wiley-interscience; 1989.
- [28] Mc Lafferty FW, Stauffer DB. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d, Palisade, Newfield. 6 1994. Wiley registry of mass spectral data.
- [29] 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.
- [30] Brereton RG. *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. New-York: Wiley Interscience; 2003.
- [31] Massart DL. *Chemometrics: A textbook*. New York: Elsevier Sciences Ltd.; 1998.
- [32] Bagamboula CF, Uyttendaele M, Candan F, Daferera D, Unli GV, Polissiou M, et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts. *Food Chem* 2004; **84**: 519–552.
- [33] Mighri H, Hadjlaoui H, Akrouf A, Najjaa H, Neffati M. Antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie* 2010; **13**: 380–386.
- [34] Sheng-Hsien L, Ku-Shang C, Min-Sheng S, Yung-Sheng H, Hung-Der J. Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control* 2007; **18**: 1547–1554.
- [35] Abi-Ayad M, Abi-Ayad FZ, Lazzouni HA, Rebiahi SA. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J Nat Prod Plant Resour* 2011b; **1**(1): 33–36.
- [36] Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000; **88**: 170–175.
- [37] Zouari S, Zouari N, Fakhfakh N, Bougateg A, Ayadi MA, Neffati M. Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *J Med Plant Res* 2010; **4**(10): 871–880.



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd



Document heading

doi:10.1016/S2222-1808(14)60587-9

© 2014 by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved.

Assessment of *in vitro* antimicrobial potency and free radical scavenging capacity of the essential oil and ethanol extract of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia* growing in Algeria

Ilyas Chikhi¹, Hocine Allali^{1*}, Karima Bechlaghem¹, Nadia Fekih¹, Alain Muselli², Nassim Djabou¹, Mohammed El Amine Dib¹, Boufeldja Tabti¹, Noureddine Halla³, Jean Costa²

¹University of Tlemcen, Laboratory of Natural and Bioactive Products (LASNABIO), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

²University of Corsica, UMR CNRS 6134, Laboratory of Natural Products Chemistry, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France

³University of Tlemcen, Laboratory of Physical Chemistry of Antibiotics and Antifungals, Synthesis and Biological Activities, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Hamadi Abderrahmane Lazouni, Professor, Natural Products Laboratory–Faculty of Natural and Life Sciences and the Earth and the Universe Sciences (NLS–EUS) – University of Tlemcen, Algeria, Rocate 2–Mansourah–B.P. 119–University of Tlemcen, Algeria.

Tel: (+213) 5 56 35 00 56

Fax : (+213) 40 91 10 82

E-mail : hamadi_la@yahoo.fr

Comments

This is an interesting study which confirms the potency of *C. villosa* essential oils and ethanol extract as effective antibacterial agents. In fact, tested on strong resistant bacteria which are responsible for nosocomial disease, the extracts prepared show a high activity.

Details on Page 361

ABSTRACT

Objective: To assess the antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and ethanol extract of the aerial parts of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia* growing in the West Northern region of Algeria.

Methods: Chemical composition of essential oils obtained by hydrodistillation from areal parts of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia* was investigated using gas chromatography (retention indices) and gas chromatography–mass spectrometry while the antimicrobial activities were determinate by paper disc diffusion method and minimum inhibitory concentration assays tested against four bacterial strains and one yeast and antioxidant activity was evaluated as a free radical scavenging capacity (RSC).

Results: Essential oils were dominated by non–terpenic compounds and fatty acids. However, the phenylpropanoids, monoterpenes and sesquiterpenes components were only present in small percentages. The most important antibacterial activity of essential oil was expressed on *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella typhimurium*. Antioxidant activity was evaluated as a RSC. RSC was assessed by measuring the scavenging activity of essential oil and ethanol extract on 1,1–diphenyl–2–picrylhydrazil (DPPH). Investigated ethanol extract reduced the DPPH radical formation (IC₅₀=68 µg/mL).

Conclusions: Results in this experiment indicate that the essential oil and the ethanol extract display antibacterial activity against two Gram–positive bacteria and activity to a lesser extent against two Gram–negative species. They may be a new potential source of components, which are likely to have impact on human health.

KEYWORDS

Calycotome villosa subsp. *intermedia*, Essential oil, Fatty acid, Antimicrobial activity, Radical scavenging capacity

1. Introduction

The role of natural antioxidants and antimicrobial in

disease prevention and treatment has gained interest by the health community. However, plant volatile essential oils (EOs) and solvent extracts from a wide variety of

*Corresponding author: Hocine Allali, University of Tlemcen, Laboratory of Natural and Bioactive Products (LASNABIO), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria.

Tel: (+213) 5.52.60.35.97

Fax: (+213) 43.28.65.30

E-mail: h_allali72@yahoo.fr

Foundation Project: supported by the University of Tlemcen and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the Algerian People's Democratic Republic under the project PNR (Grant NO. 267/ANDRS/2011–2013).

Article history:

Received 20 May 2014

Received in revised form 29 May, 2nd revised form 3 Jun, 3rd revised form 15 Jun 2014

Accepted 22 Jul 2014

Available online 28 Oct 2014

plants have been assessed. It is clear from these studies that these secondary plant metabolites possess anti-inflammatory, antiatherosclerotic, antitumor, antimutagenic, anticarcinogenic, antibacterial, and antiviral activities^[1,2]. The ingestion of natural antioxidants has been associated with reduced risks of cancer, cardiovascular disease, diabetes and other diseases associated with ageing^[3,4]. The use of secondary plant metabolites in medical procedures and applications in the cosmetic, pharmaceutical and food industries is crucial. The antimicrobial activities of EOs have been well recognized for many years^[5]. This activity could act as a chemical defence against plant pathogenic diseases. The development of bacterial resistance to presently available antibiotics necessitated the search for new antimicrobial agents. *Calycotome* is a genus of flowering plants in the legume family, Fabaceae. It belongs to the sub family Faboideae. It may be synonymous with *Cytisus*. *Calycotome villosa* (*C. villosa*) is a hairy perennial with yellow flower heads in branched clusters; found almost everywhere on the Algerian coast^[6]. However, no uses in the folk medicine are known for this species. Phytochemical studies have revealed that the plant is rich in flavonoids, terpenes, alkaloids, faltarinol and anthraquinones^[7]. However, very little research has been carried out on EO of the aerial part from *C. villosa*. The chemical composition of EO reported in literature was studied partially^[7,8]. Tests of the cytotoxic and antifungal activity exhibited by *C. villosa* have also been assessed^[8]. The methanol extract and the EO from *C. villosa* were non toxic ($LD_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) and inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Barosaurus lentus* and *Cryptococcus neoformans* at a dose of $500 \mu\text{g/mL}$. On the other hand, the cytotoxic activity of EO and crude methanol extract has also been evaluated and that showed strong cytotoxicity at $0.04 \mu\text{L/mL}$ ^[7], mainly due of presence of faltarinol which possesses some negative effects and toxic in relatively high concentration^[9,10]. However, it has been quite recently reported that some polyacetylenes, in particular faltarinol, isolated from carrots have been reported as having a beneficial effect on human health^[11]. Therefore, this study was undertaken in order to: (i) determine the full chemical composition of EO extracted by hydrodistillation using gas chromatography (GC) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), (ii) investigate the effectiveness “*in vitro*” on survival and growth of selected foodborne pathogens using agar disc diffusion and broth microdilution methods, and (iii) assess the antioxidant activity by means of radical scavenging capacity (RSC) of ethanol extract and EO of aerial parts from *C. villosa*.

2. Materials and methods

2.1. Plant samples

For this study, fresh plant material (aerial parts: stems,

leaves and flowers) was used. The plant was collected on March 2011, in Mansourah (S1, Latitude: $34^{\circ}52'15.56''\text{N}$, Longitude: $1^{\circ}20'20.71''\text{W}$, Altitude: 821 m) and Terny (S2, Latitude: $34^{\circ}46'58.8''\text{N}$, Longitude: $1^{\circ}18'\text{W}$, Altitude: 1525 m) forests near Tlemcen, Algeria. The botanical identity of the plant material was confirmed by Pr Benabadji Nouri and the voucher specimens are deposited at Laboratory of Ecology and Ecosystem Management, University of Tlemcen (Algeria).

2.2. Essential oil

Plant material (200 g) was subjected to hydrodistillation (in 4000 mL distilled water) for 5 h, using a Clevenger–type apparatus according to the method recommended in the European Pharmacopoeia^[12]. The EO yield was 0.01% for (S1) and 0.02% for (S2) (w/w). The EOs were dried over anhydrous sodium sulfate and then stored in sealed glass vials at $4\text{--}5^{\circ}\text{C}$ prior to analysis.

2.3. Preparation of the ethanol extract

The air-dried and powdered plant material (10 g) was extracted with 200 mL of ethanol by Soxhlet extraction for 4 h. The obtained ethanol extract was filtered and evaporated by using a rotary evaporator and freeze dryer (yield: 35.1%). The dried extract was stored at -20°C until tested.

2.4. GC analysis

GC analyses were carried out using a Perkin–Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and a fused–silica capillary columns (60 m \times 0.22 mm id, film thickness 0.25 μm), Rtx–1 (polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C . Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL/min); the injection volume was 0.2 μL . Retention indices (RI) of the compounds were determined relative to the retention times of the series of n–alkanes ($\text{C}_5\text{--}\text{C}_{30}$) with linear interpolation, using the Van den Dool and Kratz equation and software from Perkin–Elmer. Component relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors.

2.5. GC/MS analysis

Samples were analyzed with a Perkin–Elmer Turbomass detector (quadrupole), coupled to a Perkin–Elmer Autosystem XL, and equipped with the fused–silica capillary columns Rtx–1 (ion source temperature 150°C ; energy ionization 70 eV). EI mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1 second). Other GC conditions were the same as described under GC except split 1/80.

2.6. Component identification

Identification of individual components was based (i) on comparison of calculated RI, on polar and apolar columns, with those of authentic compounds or literature data, and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries and comparison of mass spectra with those of our own library of authentic compounds or literature data^[13–16].

2.7. Antimicrobial activity

Tests were performed against four bacteria reference strains: Gram-positive bacteria: *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 (*E. faecalis*), *S. aureus* ATCC 25923, Gram-negative bacteria: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 (*K. pneumoniae*), *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 (*S. typhimurium*) and a yeast: *Candida albicans* ATCC 14053 (*C. albicans*). The microorganisms were obtained from Pasteur Institute of Paris. Two different techniques were used to test the antimicrobial activity: the paper disc diffusion and the dilution agar method. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the later method.

2.7.1. Paper-disc diffusion method

Filter paper discs (6 mm in diameter) were individually impregnated with 10 µL of essential oil and 5 µL of ethanol extract (saturated with a 50 mg/mL) and placed on the inoculated plates and, after staying at 4 °C for 2 h, they were incubated at 37 °C for 18–24 h for bacteria, at 35 °C for 48 h for the yeast. The plates were incubated overnight at the appropriate temperature (see above), and the diameter of the resulting zone of inhibition was measured in millimeters. The results in the text represent the net zone of inhibition including the diameter (6 mm) of the paper disc. The scale of measurement was the following^[17](disc diameter included): ≥20 mm: zone of inhibition is strongly inhibitory; <20–12 mm: zone of inhibition is moderately/mildly inhibitory; and <12 mm is no inhibitory. All the data collected for each assay are the averages of three determinations.

2.7.2. Dilution agar method

A dilution agar method was used to determine the MIC. Stock solutions were obtained by dissolving extracts in dimethylsulfoxide (DMSO 1%). Serial dilutions were made to obtain concentrations ranging from 0 to 50 000 µg/mL of ethanol extract and EO. Each mixture was added to Mueller–Hinton agar for bacteria and Sabouraud dextrose agar with Chloramphenicol for yeast (cooled to 45–50 °C^[18,19]). Two controls were included in this test. The Petri dishes contained a sterile solution of DMSO and the culture medium, respectively. The experiments were performed in triplicate. After incubation at 37 °C for 24 h for bacteria and at 30 °C for 48 h for the yeast.

2.8. RSC

The hydrogen-donating abilities of the tested extracts were examined on the basis of the method described in literature with some modifications^[20,21]. Used as reagent, DPPH obviously offers a convenient and accurate method for titrating the oxidizable groups of natural or synthetic antioxidants. Fifty microliters of various concentrations of the EO and ethanol extract were added to 5 mL of a 0.005% (w/v) methanol solution of DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature the absorbance was read against a blank at 517 nm. Inhibition of the RSC and DPPH in percent (I %) was calculated in the following way:

$$I (\%) = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$$

Where A_0 is the absorbance of the control (containing all reagents except the test compound), and A_s is the absorbance of the tested sample.

The actual decrease in absorbance induced by the tested sample (change of color from deep-violet to light yellow) was compared to that of the positive control ascorbic acid. The IC₅₀ value represented the concentration of extract that causes 50% inhibition was determined. Experiments were carried out in triplicate and the mean value was recorded.

3. Results

3.1. GC/MS analysis of EO

The results of both analyses are shown in Table 1. Fifty compounds were identified by GC and GC/MS, which accounted for 91.1%–91.8% of the total composition. The EO was complex mixture of non-terpenic compounds, monoterpenes and sesquiterpenes. The non-terpenic compounds made up the higher contribution (65.0%–65.7%) in the EO of *C. villosa*. The content of four aliphatic compounds (heneicosane, tricosane, pentacosane and heptacosane) amounted to 39.6%–43.8%. The fatty acids (14.0%–16.7%) were found as the second main chemical classes. The GC/MS enabled the identification of five acids. Pentadecanoic acid (10.3%–12.3%) and hexadecanoic acid (3.5%–4.0%) were the main compounds which had anti-thrombus, could prevent cardiovascular disease and has the antibacterial and antifungal activities, followed by dodecanoic acid (0.2%–0.3%) with the antibacterial and antifungal activities, nonanoic acid (0.1%–0.2%) and octadecanoic acid (trace–0.1%) with the antibacterial and antifungal activities, (Tables 1 and 2). However, Z-iso Eugenol (2.4%–2.9%) was found as the major phenylpropanoid. Oxygenated compounds both mono- and sesquiterpenes were less represented. In this fraction, linalool (0.4%–1.0%), β-ionone (0.3%–0.6%), 1,8-cineole (trace–0.4%), L-fenchone (0.2%–0.4%), borneol (0.4%) and camphor (trace–0.1%) were the main oxygenated monoterpenes. E-β-damascenone (1.9%–3.7%), Z-jasmone (0.5%–0.6%) and Z-falcarinol (0.2%–0.4%) were the major

oxygenated sesquiterpenes. Other hand the mono- and sesquiterpene hydrocarbons compounds were represented by a single compound, the limonene (0.6%–1.4%) and α -cubebene (trace–0.9%) respectively (Table 1).

Table 1Chemical composition of EO of *C. villosa*.

No ^a	Components	RI _a ^b	RI _a ^c	(S1) ^d	(S2) ^d	Identification
1	E-2-hexenal	832	832	trace	0.5	RI, MS, Ref ₁
2	E-2-heptenal	927	924	0.6	0.1	RI, MS, Ref ₂
3	Benzaldehyde	933	932	0.2	–	RI, MS
4	1,8-Cineole	1022	1026	0.4	trace	RI, MS
5	Limonene	1025	1031	0.6	1.4	RI, MS
6	Acetophenone	1033	1034	0.3	0.4	RI, MS, Ref ₂
7	L-fenchone	1066	1059	0.2	0.4	RI, MS, Ref ₂
8	Nonanal	1086	1087	0.4	1.8	RI, MS
9	Linalool	1087	1089	0.4	1.0	RI, MS
10	Camphor	1125	1131	0.1	trace	RI, MS
11	Borneol	1148	1144	0.4	0.4	RI, MS
12	Dodecane	1200	1198	0.1	0.4	RI, MS
13	Nonanoic acid	1263	1267	0.2	0.1	RI, MS, Ref ₂
14	Undecan-2-one	1274	1273	0.4	0.2	RI, MS
15	Undecanal	1286	1286	0.2	0.3	RI, MS
16	(E,E)-2,4-Decadienal	1288	1291	0.4	0.5	RI, MS
17	Tridecane	1300	1301	0.4	0.8	RI, MS
18	α -Cubebene	1355	1353	0.9	trace	RI, MS
19	E- β -damascenone	1362	1361	1.9	3.7	RI, MS
20	Z- β -isoeugenol	1370	1367	2.4	2.9	RI, MS
21	Z-jasmone	1373	1379	0.6	0.5	RI, MS, Ref ₂
22	Dodecanal	1384	1386	0.2	0.1	RI, MS
23	Tetradecane	1400	1399	0.8	1.0	RI, MS
24	β -Ionone	1463	1468	0.6	0.3	RI, MS
25	Tridecan-2-one	1479	1473	6.8	5.6	RI, MS
26	Tridecanal	1486	1484	0.2	0.4	RI, MS
27	Pentadecane	1500	1499	0.7	0.3	RI, MS
28	Dodecanoic acid	1556	1555	0.3	0.2	RI, MS, Ref ₂
29	Hexadecane	1600	1597	0.2	0.3	RI, MS
30	Pentadecan-2-one	1682	1684	7.5	4.2	RI, MS
31	Pentadecanal	1694	1693	1.5	0.5	RI, MS
32	Heptadecane	1700	1698	0.2	0.6	RI, MS
33	Benzyle benzoate	1730	1726	0.7	0.2	RI, MS, Ref ₂
34	Octadecane	1800	1800	trace	0.3	RI, MS
35	Pentadecanoic acid	1839	1836	12.3	10.3	RI, MS, Ref ₂
36	Heptadecan-2-one	1882	1883	0.6	0.5	RI, MS, Ref ₂
37	Nonadecane	1900	1898	0.3	0.4	RI, MS
38	Hexadecanoic acid	1951	1956	4.0	3.5	RI, MS, Ref ₂
39	Z-falcarinol	1994	1998	0.4	0.2	RI, MS
40	Eicosane	2000	2000	0.7	0.4	RI, MS
41	Octadecanol	2078	2074	0.2	0.1	RI, MS
42	Heneicosane	2100	2102	6.4	15.6	RI, MS
43	Octadecanoic acid	2162	2169	0.1	trace	RI, MS, Ref ₂
44	Docosane	2200	2199	0.7	0.9	RI, MS
45	Tricosane	2300	2302	15.2	17.7	RI, MS
46	Tetracosane	2400	2400	1.4	0.9	RI, MS
47	Pentacosane	2500	2501	12.3	6.4	RI, MS
48	Hexacosane	2600	2600	0.5	0.4	RI, MS
49	Heptacosane	2700	2700	5.7	4.1	RI, MS
50	Octacosane	2800	2799	0.4	0.4	RI, MS
Total identification %				91.8	91.1	
Monoterpene hydrocarbons				0.6	1.4	
Oxygenated monoterpenes				2.1	2.3	
Sesquiterpene hydrocarbons				0.9	–	
Oxygenated sesquiterpenes				2.9	4.2	
Phenylpropanoids				3.6	3.5	
Fatty acids				16.7	14.0	
Non-terpenic compounds				65.0	65.7	

^a: order of elution is given on apolar column (Rt_x-1); ^b: retention indices of literature on the apolar column (RI_a); ^c: retention indices on the apolar Rt_x-1 column (RI_a); ^d: percentage (%); S1: Mansourah; S2: Temy; RI: retention indices; MS: mass spectrometry in electronic impact mode; Ref₁: compounds identified from literature data[13]; Ref₂: compounds identified from literature data[14].

3.2. Antimicrobial activity

3.2.1 Paper disc diffusion method

The *in vitro* antibacterial activities of EO and ethanol extracts of *C. villosa* against the employed bacteria were qualitatively and quantitatively assessed by the presence or absence of inhibition zones. The results of the bioassay are shown in Table 3. The inhibition zone, measured in millimeters, including the diameter of the paper disc, was used as the criterion for measuring the antibacterial activity of *C. villosa* EO and ethanol extract. Table 3 shows that the tested extracts could be classified according to their activity. The high activity extract of this plant was EO with an antimicrobial inhibition zone of 14 and 13 mm against *S. aureus* and *E. faecalis* respectively and lowly activity against *K. pneumoniae* and *S. typhimurium* with an antimicrobial inhibition zone of 11 mm. The ethanol extract had average activity against two food poisonous bacteria: *S. aureus* and *S. typhimurium*, with inhibition zone of 10 mm. However, *C. albicans* strain showed no inhibition, with diameter of zones of inhibition equal to 6 mm (Table 3).

Table 2Saturated and unsaturated fatty acid identified in aerial part of *C. villosa*.

Acid components	Mol. Formula	Mol. weight
Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.4
Dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.3
Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.5
Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.4
Nonanoic acid	C ₉ H ₁₈ O ₂	158.2

Table 3Antimicrobial activity of EO and ethanol extract from *C. villosa*.

Species	Disc diffusion assay (mm)		MIC (μ g/mL)	
	EO	Ethanol extract	EO	Ethanol extract
Gram-positive bacterium				
<i>S. aureus</i>	14	10	30	21 250
<i>E. faecalis</i>	13	7	60	42 500
Gram-negative bacterium				
<i>K. pneumoniae</i>	11	8	120	42 500
<i>S. typhimurium</i>	11	10	120	21 250
Yeast				
<i>C. albicans</i>	6	6	>50 000	>50 000

3.2.2. MIC

The antimicrobial activity of the investigated EO and ethanol extract was evaluated by determining MIC values against two Gram-positive and two Gram-negative bacteria as well as against one fungal strain. The results exhibited that the EO had varying degrees of growth inhibition against the bacterial strains (Table 3). However, no activity was registered against *C. albicans*. The Gram-positive strains showed more susceptibility to the tested EO than the Gram-negative ones. The most prominent inhibitory

action of EO was observed against *S. aureus* and *E. faecalis* with a MIC of 30 and 60 µg/mL respectively. However, *K. pneumoniae* and *S. typhimurium* showed low activity with MIC values of 120 µg/mL. Furthermore, the ethanol extract of *C. villosa* also shows antimicrobial properties with MIC values ranging from 21.2 to 42.5 mg/mL (Table 3).

3.3. RSC

In order to assess the RSC potential of the EO and ethanol extract, the reactivity towards the stable free radical DPPH was measured. DPPH is one of the chemical compounds that possess a proton free radical and it shows a maximum absorption at 517 nm because of its bright purple color. When DPPH encounters proton radical, its purple color fades rapidly and this scavenging action forms the basic mechanism for measuring antioxidant activity. Table 4 demonstrates DPPH scavenging activity, expressed in percentage, caused by different concentrations of EO and ethanol extract from *C. villosa*. The weakest RSC was exhibited by the EO (60%), whereas the strongest activity was exhibited by the ethanol extract (96%) at a concentration of 200 µg/mL, comparing with the effect of ascorbic acid at this concentration (Table 4).

Table 4

DPPH radical-scavenging of EO and ethanol extract from *C. villosa* at different concentrations.

Source	Concentrations (µg/mL)	Inhibition (%)	IC ₅₀ values (µg/mL)
Ethanol extract	50	30.00	68
	80	52.00	
	100	92.00	
	200	96.00	
Essential oil	100	6.00	1250
	400	13.00	
	800	42.00	
	1600	60.00	
Ascorbic acid	40	38.32	47
	80	96.16	
	100	98.02	
	200	98.61	

4. Discussion

The EO of *C. villosa* contains the non-terpenic compounds and fatty acids as the main component, followed by phenylpropanoids and oxygenated sesquiterpenes. The EO was relatively poor in monoterpenes. When the chemical composition of the EO of the studied plant was compared to that obtained for *C. villosa* gathered in Italy[7], we noted a significant difference in the percentages of its constituents and

number of molecules identified. The results of the study indicated that EO of *C. villosa* exerted higher antibacterial activity than ethanol extract. Regarding to the composition of the EO of *C. villosa*, various chemical compounds isolated by hydrodistillation have direct activity against many species of bacteria. Oxygenated monoterpenes such as camphor, borneol and linalool, were reported to be responsible for the antimicrobial activity of several EOs[22]. However, phenylpropanoids are highly active against a broad spectrum of microorganisms[23,24]. The importance of the hydroxyl group has been confirmed and the relative position of the hydroxyl group on the phenolic ring does not appear to strongly influence the degree of antibacterial activity[25,26]. Moreover, the predominance of fatty acids (14.0%–16.7%) could probably contribute to the observed activity, since many fatty acids are known to have antibacterial and antifungal properties[27]. Furthermore, polyacetylenes, in particular falcarinol taken in small quantities has been reported as having a beneficial effect on human health[10,28]. Recent reports on ginseng roots have showed antimutagenic properties and stimulatory effects on the immune system during bacterial infection probably due to the presence of falcarinol and related polyacetylenes. Consequently, the antibacterial activity of *C. villosa* could be attributed to the presence of many compounds such as, oxygenated monoterpenes, phenylpropanoids, fatty acids and falcarinol or to the synergistic effect between these compounds. Regarding RSC activity, it was observed that the ethanol extract of *C. villosa* showed a significant dose dependent inhibition of DPPH radical scavenging activity compared to EO. The extract exhibited a noticeable activity at low concentrations. This suggests that extracts contain compounds that are capable of donating hydrogen to a free radical in order to remove odd electron which is responsible for radical's reactivity. According to these results, there is a relationship between chemical composition and antioxidant activity. Moreover, as reported in literature data, the antioxidant activity of ethanol extract could be attributed to phenolic compounds, flavonoids and alkaloids[29].

In conclusion, the GC/MS analysis of the EO in the aerial parts of *C. villosa* revealed that the chemical compositions obtained differed from that investigated previously. The *C. villosa* was rich in non-terpenic compounds and fatty acids with tricosane, pentacosane, pentadecanoic acid, heneicosane, pentadecan-2-one and tridecan-2-one as major components. Hexadecanoic acid is

the main compounds which has anti-thrombus, can prevent cardiovascular disease and has the antibacterial and antifungal activities^[27,30–32]. Dodecanoic acid and octadecanoic acid have the antibacterial and antifungal activities^[27,31,32]. This oil exhibited the best antibacterial activity against *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* and *S. typhimurium* bacterias. However, the ethanol extract exhibited a different range of RSC. The components responsible for the antioxidant activities of the extract were not identified and further studies are in progress in our laboratory to isolate the active components of *C. villosa* responsible for this activity.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

I wish to thank Professor N. Benabadi of the Botanical Laboratory, Biology Department, Abou Bekr Belkaïd University for the botanical identification of the *Fabaceae* obtained from numerous sources. This work was financially supported by the University of Tlemcen and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the Algerian People's Democratic Republic under the project PNR (Grant. No. 267/ANDRS/2011–2013).

Comments

Background

C. villosa is widely distributed in Algeria. Tests of the cytotoxic and antifungal activity exhibited by *C. villosa* have been assessed. Since detailed *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of *C. villosa* aerial parts have not yet been explored, the authors undertook a detailed investigation in order to determine the full chemical composition of essential oil, to investigate the effectiveness *in vitro* on survival and growth of selected foodborne pathogens, and to screen antioxidant activity of both ethanol extract and essential oil.

Research frontiers

This study is to ascertain the antibacterial and

antioxidant effects of *C. villosa* essential oils and ethanol extract against ascorbic acid.

Related reports

Earlier works by Loy *et al.*, 2001 and Dessì *et al.*, 2001, recorded comparable antioxidant and antibacterial effects of essential oils and alcoholic extracts.

Innovations & breakthroughs

The paper provides information on the efficacy of *C. villosa* essential oils as antibacterial agent against Gram-positive bacteria: *E. faecalis*, *S. aureus*, which account for the majority of episodes of bacteremia in critically ill patients in the hospital environment: the high level of natural resistance to antibiotics of these bacteria contributes to its pathogenicity and nosocomial risk.

Applications

The result of this study confirms *C. villosa* as a formidable source of interesting components, which are likely to have impact on human health.

Peer review

This is an interesting study which confirms the potency of *C. villosa* essential oils and ethanol extract as effective antibacterial agents. In fact, tested on strong resistant bacteria which are responsible for nosocomial disease, the extracts prepared show a high activity.

References

- [1] Pragada RR, Vangepurapu V, Ethadi SR, Praneeth VS. Phytochemical investigation and *in vitro* anti oxidant, anti microbial activity of different fractions of *Acalypha indica* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; **3**(4): 314–317.
- [2] Biradar SR, Rachetti BD. Extraction of some secondary metabolites & thin layer chromatography from different parts of *Centella asiatica* L. (URB). *Am J Life Sci* 2013; **1**(6): 243–247.
- [3] Nugroho A, Kim EJ, Choi JS, Park HJ. Simultaneous quantification and peroxynitrite-scavenging activities of flavonoids in *Polygonum aviculare* L. herb. *J Pharm Biomed Anal* 2014; **89**: 93–98.
- [4] Ivanišová E, Tokár M, Mocko K, Bojňanská T, Mareček J, Mendelová A. Antioxidant activity of selected plant products. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 2013; **2**(1): 1692–1703.
- [5] Carović-Stanko K, Orlić S, Politeo O, Strikić F, Kolak I, Milos M, et al. Composition and antibacterial activities of essential

- oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chem* 2010; **119**(1): 196–201.
- [6] Quézel P, Santa S. *New flora of Algeria and the Southern desert regions*. Paris, France: National Center for Scientific Research; 1963, p. 484–485.
- [7] Loy G, Cottiglia F, Garau D, Deidda D, Pompei R, Bonsignore L. Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) link leaves. *Farmaco* 2001; **56**: 433–436.
- [8] Dessí MA, Deiana M, Rosa A, Piredda M, Cottiglia F, Bonsignore L, et al. Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia. *Phytother Res* 2001; **15**: 511–518.
- [9] Hensen L, Hammershøy O, Boll PM. Allergic contact dermatitis from falcarinol isolated from *Schefflera arboricola*. *Contact Dermatitis* 1986; **14**: 91–93.
- [10] Christensen LP. Aliphatic C(17)–polyacetylenes of the falcarinol type as potential health promoting compounds in food plants of the Apiaceae family. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2011; **3**(1): 64–77.
- [11] Tan KW, Killeen DP, Li Y, Paxton JW, Birch NP, Scheepens A. Dietary polyacetylenes of the falcarinol type are inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Eur J Pharmacol* 2014; **15**: 346–352.
- [12] Council of Europe. *European pharmacopoeia*. 5th ed. Strasbourg, France: Council of Europe; 2005.
- [13] König WA, Hochmuth DH, Joulain D. *Terpenoids and related constituents of essential oils*. Hamburg, Germany: Library of MassFinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry; 2001.
- [14] National Institute of Standards Technology. PC Version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Norwalk, Conn, USA: Perkin Elmer Corporation; 2005.
- [15] Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation; 2001.
- [16] National Institute of Standards Technology. PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Norwalk, Conn, USA: Perkin Elmer Corporation; 1999.
- [17] Espina L, Somolinos M, Lorán S, Conchello P, García D, Pagán R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* 2011; **22**(6): 896–902.
- [18] Rahimi–Nasrabadi M, Pourmortazavi SM, Nazarian S, Ahmadi F, Batooli H. Chemical composition, antioxidant, and antibacterial activities of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus oleosa* leaves. *Int J Food Prop* 2013; **16**(5): 1080–1091.
- [19] Dib MA, Bendahou M, Bendiabdellah A, Djabou N, Allali H, Tabti B, et al. Partial chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus crinitus* Desf. extracts. *Crasas y Aceites* 2010; **61**(3): 271–278.
- [20] Chikhi I, Allali H, Dib MEA, Halla N, Muselli A, Tabti B, et al. Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of *Iris planifolia* (Mill) from Algeria. *J Med Plants Res* 2012; **6**(10): 1961–1968.
- [21] Alam MdN, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmac J* 2013; **21**: 143–152.
- [22] Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forsch Komplementmed* 2009; **16**: 79–90.
- [23] Lanfranchi DA, Laouer H, El Kolli M, Prado S, Maulay–Bailly C, Baldovini N. Bioactive phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J Agric Food Chem* 2010; **58**(4): 2174–2179.
- [24] Sienkiewicz M, Łysakowska M, Denys P, Kowalczyk E. The antimicrobial activity of thyme essential oil against multidrug resistant clinical bacterial strains. *Microb Drug Resist* 2012; **18**(2): 137–148.
- [25] Leopoldini M, Pitarch IP, Russo N, Toscano M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *J Phys Chem A* 2004; **108**: 92–96.
- [26] Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* 2005; **53**(20): 7749–7759.
- [27] Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, et al. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat Prod Rep* 2010; **27**: 238–254.
- [28] Hansen SL, Purup S, Christensen LP. Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L). *J Sci Food Agric* 2003; **83**: 1010–1017.
- [29] Wong CC, Li HB, Cheng KW, Chen F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem* 2006; **97**: 705–711.
- [30] Reid KA, Jäger AK, Light ME, Mulholland DA, Van Staden J. Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceae species and isolation of antibacterial compounds. *J Ethnopharmacol* 2005; **97**(2): 285–291.
- [31] McGaw LJ, Jäger AK, Van Staden J. Isolation of antibacterial fatty acids from *Schotia brachypetala*. *Fitoterapia* 2002; **73**: 431–433.
- [32] Seidel V, Taylor PW. *In vitro* activity of extracts and constituents of *Pelargonium* against rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2004; **23**: 613–619.

ملخص :

ان الغاية من هذا البحث هو دراسة ثلاثة نباتات ذات فوائد طبية ومميزات عطرية. وجدت صدى واسعا في الاوساط الشعبية والمحلية ; والتي تنتمي الى عائلة الصنوبريات. فالمرحلة الاولى من الدراسة هو استخلاص الزيوت الطيارة *P.halepensis, P.pinea, P.pinaster* وتحديد تركيبها الكيميائي وذلك باستخدام التحليل الكروماتوغرافي CPG ,CPG -SM في حين المرحلة الثانية من الدراسة هو دراسة فعالية الزيوت ضد البيكتيريا, وعلى قدرتها المضادة للاكسدة.

الكلمات المفتاحية: الصنوبريات , الزيوت الطيارة ; التحليل الكروماتوغرافي ; ضد البيكتيريا ; قدرتها المضادة للاكسدة.

Résumé :

Le but de ce travail est l'étude de trois espèces médicinales et aromatiques appartenant au même genre *Pinus* de la famille des Pinacées, elles sont très utilisées par la population locale.

La première partie de cette étude concerne l'extraction et l'analyse des huiles essentielles de *P.halepensis, P.Pinea* et *P.pinaster* par CPG et CPG/SM.

La deuxième partie consiste en l'étude de l'activité antioxydante et anti microbienne des huiles essentielles. L'activité antioxydante est évaluée par la méthode de la réduction du radical DPPH[•] et par la réduction du fer. En outre, le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est étudié par la méthode de disc et de la dilution en milieu liquide, sur des souches bactériennes de références.

Mot clé : Pinacées, huile essentielle, CPG et CPG/SM, pouvoir antimicrobien, activité antioxydante

Abstract:

The aim of this work is the study of three medicinal and aromatic plants belongs to the family of *Pinaceae*, wich are very used in the local population.

The first part of this study concerns the extraction and the quantification of essential oil of *P.halepensis, P.Pinea* and *P.pinaster*.

The second part is the study of the antioxidant and antimicrobial activities of essential oils.

The antioxidant activity of essential oils is tested by the method of reduction of DPPH radical and iron reduction. The antimicrobial activity of the oil was evaluated using paper disc and the method of broth dilution on bacterial reference strains.

Keywords: *Pinaceae*, essential oil, GC and GC/MS, antimicrobial activity, antioxidant activity