

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahlab – Blida

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologie



Mémoire de fin d'étude

Option : Biotechnologie et valorisation des plantes

Thème :

Caractérisation et études de quelques activités thérapeutiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat des aiguilles de pin d'Alep : *Pinus halepensis L*

Présenté par :

**Nait Bachir khadidja
Settoug Fatiha**

Soutenue le : 07/07/2019

Devant le jury :

Présidente : Mr Bendali A.	MAA	USDB
Examinatrice : M^{me} Chabata N.	MAA	USDB
Promotrice : M^{me} Ghania R.	MAA	USDB
Co-promoteur : M^f Nait bachir Y.	MCB	USDB

Promotion 2019-2020

Remerciement

Nous tenons à remercier le Dieu de nous avoir donné le courage et la patience afin que ce travail puisse voir le jour.

Nous exprimons notre profond remerciement à notre promotrice M^{me} GHANAI R maître Assistante à la faculté d'Agronomie, Université Saad Dahlab de Blida pour avoir accepté de nous encadrer pour sa précieuse recommandation, sa patience et surtout sa gentillesse.

A notre Co-promoteur M^r NAIT BACHIR Y pour ses conseils, son orientation et sa disponibilité tout au long de notre stage pratique.

Je remercie également les membres du jury M^R BENDALI A qui nous a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury et M^{me} CHABATA N d'avoir consacré leur temps à la lecture et d'examiner notre travail.

A toute l'équipe de laboratoire des huiles essentielles, de microbiologie et de pharmacotoxicologie de CRD-Saïdal Gué de Constantine, et laboratoire d'extraction des substances naturelle Bainem et celui de laboratoire national de police scientifique et technique d'Alger .

Je remercie également BOUMARAF S pour sa gentillesse et surtout sa nous aide.

Nos remerciements vont aussi à monsieur CHOÛRA Mostapha chef de division à la DGSN, ainsi que tous les membres du laboratoire de police scientifique, Châteauneuf, d'Alger.

Enfin je tiens à exprimer mes profonds remerciements à tous ceux qui m'en soutenu de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

****Dédicace****

Avant tout je remercie *ALLAH* pour le tout.

A la femme la plus courageuse, sensible, généreuse, sources de tendresse, à celle qui a su me donner amour et joie de vivre, à celle qui a souffert sans ne laisse souffrir, qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, à celle qui a toujours montrée affection et compréhension à mon égard mon adorable mère *Samia* que j'aime.

A l'homme de courage et de force, à celui qui a toujours été présent, qui m'a appris les vraies valeurs de la vie à celui qui m'a soutenu en toutes circonstances, l'amour de ma vie mon père *chérif* que j'aime.

Merci *mes parents* pour l'affection et soutien durant mes études pour que je puisse atteindre mes objectifs : vous étiez toujours là pour m'écoutez, me sourire, me reconforter et m'encourager dans les moments de doute.

A ceux qui m'ont aidé et m'ont donné joie et bonheur :

Mes sœurs : *Malek, Mélissa, Lina.*

Mes Frères : *Bachir, Mohcine, Amine, Mahdi Adam, Imed, Malik.*

A mon cher oncle *Amir* qui ma beaucoup sous tenue pendant tout ma vie et mes études et a ma tante *Wardia* qui me manque beaucoup.

A toute la famille : *Naït Bachir*

A mes oncles *Samí* et *Saddek* et leurs familles.

A ma tante *Nawal* et leurs familles.

A mon grand père *Mustapha*, ma grand mère *Faiza* et mon grand père *Bachir* qui je souhaite une bonne santé.

A mes amis les plus fidèles en particulier *Kenza, Zineb, Affifa et Ryma.*

A mon ami *Mohamed kaki* qui m'a aidé et mon courage pendant mes études.

A ceux que j'ai eu la chance de connaître, dans les meilleurs et pires moments de ma vie. Et mon binôme Fatiha pour son entente et sa sympathie .A tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aiment, je dédie ce modeste travail.

Khadija

****Dédicace****

A la femme la plus courageuse, sensible, généreuse, à celle qui a su me donner la joie de vivre, à celle qui a toujours montrer affection et compréhension à mon égard,

Ma chère *MAMAN* que j'aime.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulé, le fruit de vos innombrable sacrifices .puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A l'homme de courage et de force, à celui qui a toujours été présent, qui m'a appris les vraies valeurs de la vie à celui qui m'a soutenu en toutes circonstances,

Mon cher *PAPA* que j'aime.

Quoi que je fasse ou que je dise, je n'arrive pas à vous remercie comme il se doit. Ton affection me couvre et ta présence à mes côtés a toujours était, elle est et elle sera ma source de force pour affronter les différents obstacles.

Merci beaucoup pour mon deuxième père et le père spirituel pour son soutien moral à son esprit pur *BABA LHADJ* el 3aziz.

A vous ma grande mère *YEMA*, ma profonde gratitude pour ton éternel amour. Que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A mon meilleur ami qui a partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail qui m'a chaleureusement supporté et encourage tout au long de mon parcours *SOFIANE*.

A ceux qui m'ont aidé et m'ont donné joie et bonheur :

Ma chère sœur *HADJER* et mon cher Frère *BRAHIM* que j'adore beaucoup.

Mon confrère *TAZGAI MOHAMED*

Mes chers cousins *TALIB GUESSOUM SOFIENE* et *SETTOUF MOHAMED* que je n'oublierais jamais leurs soutiens.

Mes amis les plus fidèles en particulier *HAKIM, BIBICHO, HASNA* et *FATMA*.

A toute ma famille *MATERNELLE* et *PATERNELLE*.

A tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aiment, je dédie ce modeste travail.

Fatiha

Résumé

Ce travail vise la caractérisation et l'étude de quelques activités thérapeutiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat des aiguilles de pin d'Alep : *Pinus halepensis L*

L'extraction de l'HE des aiguilles de Pin d'Alep, par hydro distillation a donné un rendement de (0.83%).

L'identification des différents composants chimiques par CG /SM nous a permis de déterminer 20 composants importants dont le beta-caryophyllene est qui est un composé majoritaire (34.6%). D'autres composants sont présents avec des teneurs moins élevés, à savoir : le gamma-terpinene (11.7%), le 2-carene (9.9 %),le p-cymene (9.1 %),le 1,6-octadiene-3-ol, 3,7-dimethyl (6.1%) et le thymol (3.8%).

L'étude de l'activité anti inflammatoire, de l'huile essentielle et de l'hydrolat, par le test de Levy, réalisé sur des souris, a montré un pourcentage de réduction de l'œdème de 62.81% pour l'huile essentielle et de 48.43%pour l'hydrolat. Ce dernier résultat est moins important par rapport à la valeur de réduction obtenu par le produit de référence Ibuprofène ® (52.76%).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'hydrolat a été réalisée selon la méthode de l'aromatogramme. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle possède un effet légèrement inhibiteur sur les trois souches : *staphylococcus aureus* (Diametre d'inhibition =12.5 mm), *Candida albicans* (12.5mm), *Saccharomycète cerevisiae* (12.75mm).Cependant, elle s'avère non efficace vis-à-vis des trois autres souches étudiées : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*,. L'hydrolat a montré une activité légèrement inhibitrice sur *Escherichia coli* (13 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (14.5mm). Toute fois elle semble non inhibitrice sur les autres souches :*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* , *Candida albicans*, et *Saccharomycès cerevisiae*..

L'activité antioxydant de l'huile essentielle et de l'hydrolat a été testée également par la méthode des radicaux de balayage DPPH. Les résultats obtenus montrent l'existence d'un pouvoir antioxydant important de l'hydrolat de *Pinus halepensis L* avec une IC₅₀ =0.487 (mg/ml) .

Le produit obtenu par la formulation de l'huile essentielle a présenté un pourcentage d'inhibition de l'œdème de (84.64 %) Cette valeur est supérieure à celle obtenue par l'huile essentielle naturelle pure (62.81%).

Mots clés : *Pinus halepensis L*, huile essentielle, hydrolat, CG/SM, activité anti inflammatoire, activité anti microbienne, activité antioxydant, formulation.

الملخص

يهدف هذا العمل إلى توصيف ودراسة بعض الأنشطة العلاجية للزيوت العطرية وهيدروليك إبر الصنوبر الحلبي :

Pinus halepensis L

أعطى استخراج HE من إبر صنوبر حلب بالتقطير المائي عائداً (0.83%).

لقد سمح لنا تحديد المكونات الكيميائية المختلفة بواسطة GC / MS بتحديد 20 عنصراً مهماً من بينها beta- caryophylleneest, مكون رئيسي (34.6%). توجد مكونات أخرى بمستويات أقل، وهي: gamma- terpinene (11.7%) ، carene-2 (9.9%) ، p-cymene (9.1%) ، 3,7dimethyl ، lo-3- octadiene-1,6 (6.1%) و thymol (3.8%).

أظهرت دراسة النشاط المضاد للالتهابات ، الزيوت الأساسية والهيدروولات ، بواسطة اختبار ليفي ، التي أجريت على الفئران ، انخفاضاً في نسبة الوذمة بنسبة 62.81% بالنسبة للزيوت الأساسية و 48.43% للهيدروسول. هذه النتيجة الأخيرة أقل أهمية مقارنة بقيمة التخفيض التي حصل عليها المنتج المرجعي ® Ibuprofen (52.76%).

تم إجراء تقييم للنشاط المضاد للميكروبات من الزيوت الأساسية والهيدرات وفقاً لطريقة العلاج العطري. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الزيت العطري له تأثير مثبت قليلاً على السلالات الثلاثة: *staphylococcus aureus* (قطر التثبيط = 13 مم) ، *Candida albicans* (12.5 مم) ، *Saccharomycès cerevisiae* (12.75 مم). ومع ذلك، فقد ثبت أنه غير فعال فيما يتعلق بالسلالات الثلاث الأخرى التي تمت دراستها: (*Escherichia coli* ,

Bacillus subtilis , *Pseudomonas aeruginosa*) أظهرت الهيدروولات نشاطاً مثبتاً قليلاً على *Escherichia coli* (13 مم) و *Pseudomonas aeruginosa* (14.5 مم). ومع ذلك، يبدو غير مثبت على سلالات أخرى: (*Saccharomycès cerevisiae* ، *Bacillus subtilis* , *Staphylococcus aureus* , *Candida albicans*)

تم اختبار نشاط مضادات الأكسدة للزيوت الأساسية والهيدرات أيضاً عن طريق طريقة المسح DPPH الجذرية.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود قوة هامة مضادة للأكسدة في هيدرات *Pinus halepensis L* مع IC50= 0.487 (ملغم / مل).

أظهر المنتج الذي تم الحصول عليه بتركيب الزيوت العطرية نسبة تثبيط للوذمة (84.64%). هذه القيمة أعلى من تلك التي تم الحصول عليها بالزيت العطري طبيعي نقي (62.81%).

الكلمات المفتاحية : *Pinus halepensis L* ، زيت أساسي ، هيدروولات ، ، CG / MS ، نشاط مضاد للالتهابات ، نشاط مضاد للميكروبات ، نشاط مضاد للأكسدة ، صياغة

Liste des figures

Figure 1 : <i>Pinus halepensis</i> L (aiguille, cône)	5
Figure 2 : L'espace vital de <i>Pinus halepensis</i> au stade bioclimatique semi-aride de la forêt de Balloul (Saïda), (avril 2011, photo KEFIFA) cité par <i>Kefifa et, Benabdeli 2014</i>	5
Figure 3 : Air de répartition de pin d'Alep dans la région méditerranéenne (Quezel, 1986 ; in Bouceddi, 2016).....	7
Figure 4 : Répartition géographique de <i>Pinus Halepensis</i> .(BentouatiE, 2006 ; in Mezarai,2014).....	8
Figure 5 : Morphologie des nanoparticules (Craveiro., et al 1989).....	15
Figure 6 : Localisation du parc national de Chréa Blida.....	19
Figure 7 : Dispositif de l'extraction des huiles essentielles par hydro distillation (Clevenger)(2019).....	22
Figure 8 : Récupération de l'hydrolat par rota-vapeur.....	23
Figure 9 : Principe de fonctionnement de CG/MS.....	24
Figure 10 : Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Zaiki , 1988).....	30
Figure 11 : Teneur en eau et de la matière sèche de <i>Pinus halepensis</i> L.....	34
Figure 12 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> L.....	35
Figure 13 : Pourcentages de l'augmentation de l'œdème.....	37
Figure 14 : Pourcentages de réduction de l'œdème.....	38
Figure 15 : les résultats de l'activité anti oxydant des aiguilles de <i>Pinus halepensis</i>	43
Figure 16 : les résultats de la IC ₅₀	44
Figure 17 : les résultats représentent l'analyse de l'huile essentielle par granulométrie laser.	45
Figure 18 : les résultats représentent l'analyse du potentiel zêta.....	46

Figure 19 : <i>Pinus halepensis</i>	ANNEXE 2
Figure 20 : Les souris pour l'expérimentation	ANNEXE 2
Figure 21 : Administration par gavage	ANNEXE 2
Figure 22 : Mesure l'œdème	ANNEXE 2
Figure 23 : Injection de la carragénine	ANNEXE 2
Figure 24 : Pied à coulisse	ANNEXE 2
Figure 25 : Sacrifier les souris	ANNEXE 2
Figure 26 : coupure des pattes	ANNEXE 2
Figure 27 : Préparation de l'infusé.....	ANNEXE 2
Figure 28 : screening phytochimique	ANNEXE 2
Figure 29 : Solution méthanoliques de DPPH.....	ANNEXE 2
Figure 30 : Différentes concentration des solutions méthanoliques.....	ANNEXE 2
Figure 31 : Spectrophotomètre SHIMADZU UV –visible	ANNEXE 2
Figure 32 : L'activité inhibitrice de l'HE et de l'hydrolat de <i>Pinus halepensis</i> L.	ANNEXE 2

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification de l' espece (Gaussen et al., 1982).....	6
Tableau 2 : liste des caractéristiques des souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne	21
Tableau 3 : Composition de nano-emulsion(Nait bachir.,2018).....	32
Tableau 4: Résultats de screening phytochimiques du <i>Pinus Halepensis</i>	36
Tableau 5: Le pourcentage de l'augmentation l'œdème.....	37
Tableau 6 : Le pourcentage de la réduction de l'œdème.....	38
Tableau 7 : Résultat des testes d'inhibition de l'activité antimicrobienne de <i>Pinus halepensis L.</i>	39

Liste des abréviations

AFNOR : association française de normalisation

A.I :anti-inflammatoire

ATTC : américain type culture collectif

AW : Activité of water

CG-SM : chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

CRD : centre de recherche et de développement

DPPH :1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

DO : densité optique

Gram+ : Bactérie Gram-positive

Gram- : Bactérie Gram-négative

GX : gomme xanthane

HE : huile essentielle

HCL : acide chlorhydrique

IC₅₀: concentration inhibitrice de 50%

MF : matière fraîche

MH : Muller-Hinton

MS : matière sèche

MV : diamètre moyen de la distribution volumique

nm : nanomètre

P.h : *pinus halpensis*

R : résistant

Rdt : rendement

S : sensible

SAB : sabouraud

TSB : Bouillon Tryptone Soja

UV : ultra-violet

UV-vis : ultra-violet visible

V : volume

Vit C : vitamine C

ZI : zone inhibitrice

βCD: beta cyclodextrine

ζ : potentiel zêta.

Table des matières

Résumé	
Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : Etude de la plante	
I.1 . Généralités sur le genre Pinus	4
I.2. Description botanique.....	4
I.3. Noms vernaculaires	5
I.4. Classification de l'espèce	6
I. 5. Répartition géographique.....	6
I.6. L'Origine et habitat	8
I.7.Ecologie	9
I.8. Usage et propriétés thérapeutique	9
I.9 .Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Pinus halepensis</i>	9
Chapitre II : Les huiles essentielles et les hydrolats	
II.1. Les huiles essentielles.....	11
II.1.1.Définition	11
II.1.2.Répartition et localisation	11
II.1.3. Les techniques d'extraction	12
II.1.3.1. Hydro-distillation	12
II.1.3.2. Entraînement à la Vapeur	12
II.1.4.Classification	12
II.1.5.Propriétés physico-chimiques.....	13
II.1.6.Composition chimique et biosynthèse des huiles essentielles	13
II.1.7.Facteurs affectant la variabilité de la composition des huiles essentielles.....	13

II.1.8.Les techniques d'analyse.....	14
II.1.8.1. Le couplage CG/SM	14
II.1.9.Les nano/microsystèmes pour l'encapsulation des substances naturelles.	15
II.1.9.1. La nano/micro-technologie un défi pour la science.....	15
III.1.9.2. Intérêt de la réduction de taille dans le domaine biologique.....	16
II.1.10.Conservation	16
II.1.11.Toxicité des huiles essentielles	16
II.2. Les hydrolats.....	16
II.2.1.Description des hydrolats.....	17
II.2.2.Composition	17
II.2.3.Utilisation	17
II.2.4.Conservation	17
Partie expérimentale	
Matériels et méthodes	
I. Matériels.....	19
I.1. Matériel végétal	19
I.1.1.Caractéristique de la station de l'échantillonnage	19
I.2. Matériel animal	20
I.3 .souches microbiennes	20
II. Méthodes d'études	21
II.1.Détermination de la teneur en eau	21
II.2 .L'extraction de l'huile essentielle et récupération de l'hydrolat	22
II.3.. Détermination du rendement en HE.....	23
II.4. Composition chimique des extraits	24
II.4. 1.Analyse de l'huile essentielle par CG/SM	24

II.4. 2.Screening phytochimiques	24
II.5.Etudes des activités biologiques.....	26
II.5.1. Activité anti-inflammatoire.....	26
II.5.2.Activité antimicrobienne.....	28
II.5.3. Activité antioxydant.....	30
II.6. Formulation et caractérisation d'une nano-émulsion à effet anti-inflammatoire à base de l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis L.</i>	32
II.6.1.Formulation de la nono-émulsion	32
II.6.2.Analyse de la formulation par granulométrie laser	33
II.6.3.Analyse du potentiel zêta.....	33
II.6.4.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	33
Résultats et discussion	
III.1. La teneur en eau	34
III.2. Etude du rendement.....	34
III .3. Composition chimique des extraits.....	35
III.3.1. Analyse de l'huile essentielle par CG/SM	35
III.3. 2.Screening phytochimiques	35
III.4.Etudes des activités biologiques.....	36
III.4.1. Activité anti-inflammatoire.....	36
III.4.2.Activité antimicrobienne.....	40
III.4.3. Activité antioxydant.....	43
III.5. Formulation et caractérisation d'une nano-émulsion à effet anti-inflammatoire à base de l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis L.</i>	45
Conclusion	47
Référence bibliographiques	49
Annexe	

Summary

This work aims at the characterization and the study of some therapeutic activities of the essential oil and the hydrosol of the needles of pine of Aleppo : *Pinus halepensis L*. Extraction of HE from Aleppo pine needles by hydro-distillation gave a yield of (0.83%).

The identification of the different chemical components by GC / MS allowed us to determine 20 important components of which beta-caryophyllene is a major component (34.6%). Other components are present with lower levels, namely: gamma-terpinene (11.7%), 2-carene (9.9%), p-cymene (9.1%), 1,6-octadiene-3-ol, 3,7-dimethyl (6.1%) and thymol (3.8%).

The study of the anti-inflammatory activity, the essential oil and the hydrosol, by the Levy test, carried out on mice, showed a reduction percentage of the edema of 62.81% for the essential oil and 48.43% for hydrosol. This last result is less important compared to the reduction value obtained by the reference product Ibuprofen® (52.76%).

The evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil and the hydrosol was carried out according to the aromatogram method. The results obtained showed that the essential oil has a slightly inhibitory effect on the three strains: *staphylococcus aureus* (diameter of inhibition = 12.5 mm), *Candida albicans* (12.5mm), *Saccharomycès cerevisiae* (12.75mm). However, it proved to be ineffective with respect to the three other strains studied: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ,. The hydrosol showed a slightly inhibitory activity on *Escherichia coli* (13 mm) and *Pseudomonas aeruginosa* (14.5mm). However, it seems non-inhibitory on other strains: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, and *Saccharomycès cerevisiae*.

The antioxidant activity of the essential oil and the hydrosol was also tested by the DPPH scanning radical method. The results obtained show the existence of an important antioxidant power of the *Pinus halepensis L* hydrolate with an IC50 = 0.487 (mg / ml).

The product obtained by the formulation of the essential oil showed a percentage of inhibition of the edema of (84.64%) This value is higher than that obtained by the pure naturel essential oil (62.81%).

Key words : *Pinus halepensis L*, essential oil, hydrosol, CG / MS, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity, antioxidant activity, formulation.

Introduction

Depuis longtemps, la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle repose sur les plantes médicinales et sur la détermination de leur qualité par des études phytochimiques et pharmacologiques (**Muanda et al., 2009**).

De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays (**Aboughe Angone et al., 2015**).

Les différentes substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples dans le système de soins traditionnels et dans les différentes industries comme l'alimentation, la cosmétologie et en dermopharmacie (**Hebi et al., 2016**). Parmi ces substances, les métabolites secondaires comme les huiles essentielles qui se sont surtout illustrées en thérapeutique (**Mechergui et al., 2016**), et elles ont été largement étudiées pour leurs activités biologiques et constituent également un axe important pour les chercheurs (**Djerrad et al., 2015**).

Les huiles essentielles sont des produits de grande valeur ajoutée utilisées dans divers domaines tels que la parfumerie, l'agro-alimentaire, la pharmacie et l'aromathérapie, ce sont des substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants, elles ont été suggérées comme sources alternatives très importante pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires, et pour éviter les pertes post-récoltes des fruits pendant le stockage (**Serrano.,2008**).

L'Algérie, pays connu pour ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée, d'environ 3 000 espèces de plantes dont 15% endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Dif et al., 2015**).

Par ailleurs, les genres qui sont capables de les élaborer sont rassemblés dans un nombre restreint de familles comme les : Lamiaceae, Lauraceae, Asteraceae, Rutaceae, Myrtaceae, Poaceae, Cupressaceae, Piperaceae (**Mahendra et al., 2017**).

D'après **Farjon,(1990)** les pinacées sont des conifères c'est-à-dire des plantes portant des cônes est l'une des familles importante dans la flore algérienne. Cette espèce a été largement utilisée dans les projets de boisement au cours du XXème siècle (**Maestre et al, 2003**). Selon (**Ghougali .,2011**) le pin d'Alep représente la source unique ou principale de bois et de couverture forestière dans de nombreux pays méditerranéens. Économiquement, *P. halepensis* est l'espèce de conifères la plus importante d'Afrique du Nord, et a une grande importance écologique dans le sud de la France et l'Italie, surtout à l'interface ville-

Introduction

forêt. La productivité moyenne est d'environ 1-2 m³ ha⁻¹ an⁻¹ pour le pin d'Alep et leur rendement maximal peut atteindre 12-15 m³. Le bois de ce pin méditerranéen est utilisé à des fins multiples : construction, industrie, menuiserie, bois et pâte à papier. Les graines sont également utilisées pour la pâtisserie particulièrement en Tunisie.

D'autre part, le Pin d'Alep est largement utilisé en médecine traditionnelle du fait de sa capacité à diminuer l'hypercholestérolémie, de traiter les infections des voies respiratoires ainsi que ses effets antimicrobiens et antifongiques (**Cheikh-Rouhou et al., 2006 ; Cheikh-Rouhou et al., 2008 ; Lucienne, 2010; Berroukche et al., 2014**).

Malgré les différentes activités thérapeutiques, connus traditionnellement, et la richesse en molécules bioactives du pin d'Alep, peu d'études ont été réalisées sur ses activités biologiques. Certains auteurs se sont intéressés à son rapport économique et son exploitation comme ressource forestière par l'utilisation de son bois (**Ghougali ., 2011**) . En Algérie des études ont porté sur l'effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de ses graines (**Medjboub et al., 2011**),**Boukhalfa., (2008)** s'est intéressé à évaluer les rendements des huiles essentielles des espèces du genre *Pinus* provenant de différentes régions, d'autre part (**Dob et al (2002) cité par Benaziza (2017)**) se sont intéressés à la caractérisation de l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep .

D'autre part les rendements en huiles essentielles sont généralement faibles et leurs exploitations pour leurs activités biologiques peut entraîner un appauvrissement du matériel végétal dans la nature, ce qui mène, actuellement, certains auteurs à s'intéresser à la formulation d'un produit ayant une composition typique à l'extrait naturel (nano-émulsion de l'huile essentielle) grâce à la formation des complexes d'inclusion entre le β -cyclodextrines et les composés de l'huile essentielle. Ce mécanisme a été déjà proposé dans une formulation antidiabétique par **Nait bachir et al (2018)**.

Une autre étude a également montré l'existence d'un effet plus important de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle formulée. (**Donsi et al., 2011**).

L'hydrolat est un sous-produit qui se forme lors du processus d'extraction des huiles essentielles par hydro distillation, à partir de l'eau ayant servi à l'entraînement des composés volatils. Ce sous produit contient en faible quantité des molécules odorantes de la plante ainsi que des composés plus polaires non retrouvés dans l'huile essentielle (**Paolini.,2008**).

Introduction

Les hydrolats sont considérés la plupart du temps comme un déchet de l'hydro distillation.

Pourtant, certains hydrolats de plantes possèdent des propriétés thérapeutiques intéressantes et bien souvent différentes de celles de l'huile essentielle correspondante (**Catty, 2001; Price et al., 2004**), et ils possèdent des propriétés biologiques et organoleptiques, ils ont été utilisés dans les industries alimentaires et cosmétiques. Selon certains auteurs, ils sont également utilisés dans l'agriculture biologique contre les champignons, la moisissure et les insectes et pour la fertilisation des sols (**Paolini.,2008**).

Dans ce travail nous nous sommes intéressées à étudier quelques activités thérapeutiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat des aiguilles de Pin d'Alep provenant de la région de chréa d'Algérie. Cette étude sera suivie pour une formulation d'une nano-émulsion et étude de son activité anti inflammatoire. Nous avons fixées objectifs suivants :

- ✓ Extraction des huiles essentielles et récupération de l'hydrolat.
- ✓ Caractérisation de l'huile essentielle par CG/SM et analyse phytochimique des aiguilles de pin d'Alep par le screening.
- ✓ Evaluation de différentes activités biologiques : l'activité anti-inflammatoire, anti microbienne et antioxydant.
- ✓ Formulation et caractérisation d'une nano émulsion à effet anti-inflammatoire.

Matériels et méthodes

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales du département de biotechnologie, de l'université SAAD DAHLEB de Blida, ainsi qu'au laboratoire des substances naturelles, le laboratoire de pharmacotoxicologie et le laboratoire de microbiologie du centre de recherche et de développement CRD-SAIDAL.

Ce durant la période allant du mois de janvier au mois juin 2019.

- L'extraction a été réalisée au laboratoire des substances naturelles CRD-SAIDAL et laboratoire d'extraction des huiles essentielles de l'INRF de Bainem d'Alger.

Et d'autre part sur l'étude de l'activité anti-inflammatoire et l'activité microbienne ont été réalisées dans le laboratoire de pharmacotoxicologie et microbiologie CRD-SAIDAL.

- Les tests phytochimiques ont été réalisés au sein du laboratoire de recherche des plantes aromatiques et médicinales du département d'agronomie, de l'université SAAD DAHLEB de Blida.

-L'activités anti-oxydant et formulation ont été fait au niveau de laboratoire de génie chimie du département de génie des procédés, de l'université SAAD DAHLEB de Blida.

-La CG/SM a été fait au niveau de laboratoire National de Police Scientifique –Châteauneuf – Ben Aknoun.

I. Matériels :

I.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur les aiguilles de pin d'Alep (*Pinus halepensis* L), de la région de Blida chréa. Deux récoltes ont été faites :

-La première récolte a été effectuée la matinée (9h- 11h) le 20 Décembre 2018.

- Cette espèce a été séchées à l'ombre à température ambiante à l'abri de la lumière (pour éviter la photo-oxydation des substances) et dans des endroits bien aérés (pour éviter les moisissures) pendant 2 Semaines et ont été par la suite conservées dans des sacs en papier.

I.1.1.Caractéristique de la station de l'échantillonnage

Notre matériel végétal sélectionné pour cette étude a été collectée au niveau de parc national de Chréa qu'est une aire protégée et qui s'étale sur une superficie de 26587Ha. Situé à 50 Km au sud –ouest d'Alger, (**Dahel, 2015**). (Figure 6)

Selon (**Halimi 1980**), la latitude de chréa est comprise entre $36^{\circ} 19' / 36^{\circ} 30'$ Nord et $2^{\circ} 38' / 36^{\circ} 02'$ Est , Altitude de chréa 963 m ville de Blida .

Le pin d'Alep occupe la plus grand superficie de l'Atlas Blidéen avec près de 7000 ha au niveau du versant méridional de l'Atlas. Elle est caractérisée par un climat humide et exposé au vent pluvieux. (**Halimi 1980**).



Figure 6 : Localisation du parc national de Chréa Blida.

Matériels et méthodes

I.2. Matériel animal

Pour la réalisation de l'activité anti-inflammatoire nous avons utilisé des souris albinos dont les caractéristiques et les conditions d'élevage sont les suivantes :

- **Souris albinos :**

Souche : N.M.R.I.

Poids : 20g±2g

Nombres : 5/lot (5 lots).

Sexe : mâle et femelle.

- **Condition d'élevage :**

-**Origine :** élevage Institut Pasteur

-**Régime alimentaire :**

✓ **Alimentation :** Granulés « O.N.A.B ».

✓ **Boisson :** Eau de robinet ad libitum.

Température : 20 à 24°C.

Humidité : 50%.

Éclairage : 10heures / jour.

I.3 .souches microbiennes

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne de notre huile essentielle et de notre hydrolat nous avons utilisé six souches microbiennes (*Escherichia coli* –*Bacillus subtilis* –*Staphylococcus aureus*–*Pseudomonas aeruginosa* – *Candida albicans* –*Saccharomycète cerevisiae*)(Tableau 2).

Matériels et méthodes

Tableau 2 : Caractéristiques des souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne :

Nom de la souche	ATCC	Gram	Famille (Bergey's, 2001)
<i>Escherichia coli</i>	8739	-	Enterobacteriaceae
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	+	Bacillaceae
<i>Staphylococcus Aureus</i>	6538	+	Staphylococcaceae
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae
<i>Candida albicans</i>	10231	/	Cryptococcaceae
<i>Saccharomycète Cerevisiae</i>	9763	/	Saccharomycetaceae

II. Méthodes :

II.1. Détermination de la teneur en eau

Nous avons pesé 20g des feuilles du Pin frais, enroulé l'échantillon soigneusement dans du papier aluminium et placé dans une étuve réglée à 60°C pendant 24h .l'échantillon est ensuite retiré et pesé jusqu'à stabilité du poids .La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subie lors de la dessiccation ; elle est calculée selon la formule suivante :

$$(\%)d' eau = \left[\frac{MF - MS}{MF} \right] * 100$$

MF : Matière végétale fraîche en gramme (g).

MS : La matière végétale sèche en (g).

Matériels et méthodes

II.2.Extraction d'huile essentielle et récupération de l'hydrolat

L'extraction de l'huile essentielle s'est réalisée par la méthode d'hydro distillation.

Principe :

La plante contenant l'huile essentielle est immergée dans un volume d'eau, le tout contenu dans un ballon est porté à ébullition .En s'évaporant, l'eau entraîne les composés volatils de l'huile essentielle recherchée, les vapeurs se condensent ensuite dans le réfrigérant et s'écoulent à l'état liquide dans un récipient où elles forment le distillat (huile essentielle et eau).

En général, le distillat fait apparaître deux phases non miscibles : les huiles essentielles et l'eau. (Bruneton ., 1993).

Mode opératoire :

100 g des aiguilles sèche ont été coupés en morceaux afin de faciliter son introduction dans le ballon de 1 litre, rempli d'eau distillé jusqu'aux 2/3.

Le ballon est chauffé à l'aide d'un chauffe ballon jusqu'à ébullition de l'eau distillée, ceci engendre la formation de vapeurs .ces vapeurs s'élèvent et passent dans réfrigérant. Au contact des parois refroidie du réfrigérant les vapeurs chaudes se condensent et s'écoulent à l'état liquide, goutte à goutte dans le Clevenger où elles forment le distillat .Ce dernier est un mélange de deux phases non miscibles qui sont séparées l'une de l'autre par le robinet de Clevenger. (figure 7)

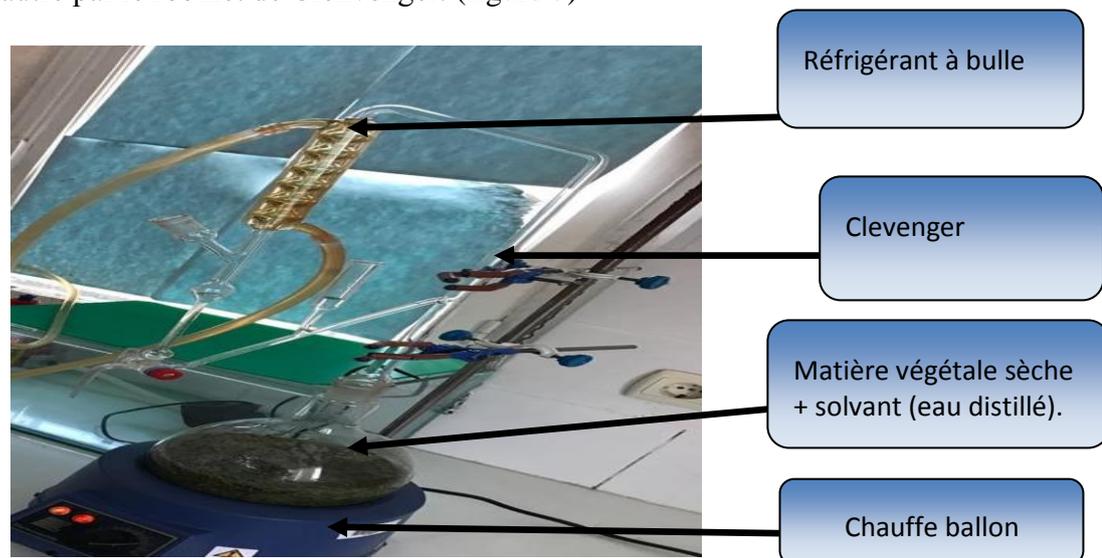


Figure 7 : Dispositif de l'extraction des huiles essentielles par hydro distillation

(Clevenger)(2019).

Matériels et méthodes

Après séparation de l'huile essentielle, l'eau qui a servi pour l'extraction a été récupérée à partir du ballon et évaporée à l'aide d'un rota-vapeur sous vide, avec un chauffage à 80°C pour obtenir une matière solide qui servira comme l'hydrolat pour l'étude des activités. (Manayi, et al., 2014). (Figure 8)



Figure 8 : Récupération de l'hydrolat par rota-vapeur (2019)

II.3. Détermination du rendement en HE :

Le rendement en HE est déterminé par le rapport entre la masse d'HE extraite et la matière végétale traitée (AFNOR, 2000). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est calculé selon la formule suivante :

$$R = \left[\frac{V}{M} \right] * 100$$

R : Rendement en HE (%).

V : Volume obtenu d'HE en (ml).

M : Poids de la matière végétale sèche en (g).

II.4. Composition chimique des extraits

II.4.1. Analyse de l'huile essentielle par CG/SM

La composition chimique de l'huile essentielle est déterminée en utilisant un appareil de Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (CG/SM). L'appareil est de modèle CLARUS 500 de marque Perkin-Elmer. La Méthode consiste à faire injecter un volume de : 1 μ l, Le système utilisé est équipé d'une colonne (Elite série 5-MS, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μ m épaisseur de phase stationnaire). La température de l'injecteur est : 250°C, la température initiale est : 70°C pendant 4 min, la Rampe est : 4deg/min jusqu'à 220°C pendant 15 min et le Temps d'analyse est de 56.5 min.

Pour la MS ; le Mode d'ionisation: Impact électronique ,Energie: 70 ev ,Temperature: source: 250°C ,Temperature ligne de transfert: 250°C ,Analyseur: Quadripôle ,Mode: Balayage entre 20 - 550 dalton ,Delia de solvant: 5.9 min.

L'identification des composés est basée sur la comparaison des temps de rétention de ces derniers avec les standards identifiés et la base de données informatique en utilisant les temps de rétention d'une série d'alcane (Singh ., 2008 ; Castro et al .,1998) la figure 9 représente le fonctionnement d'un couplage CG/MS :

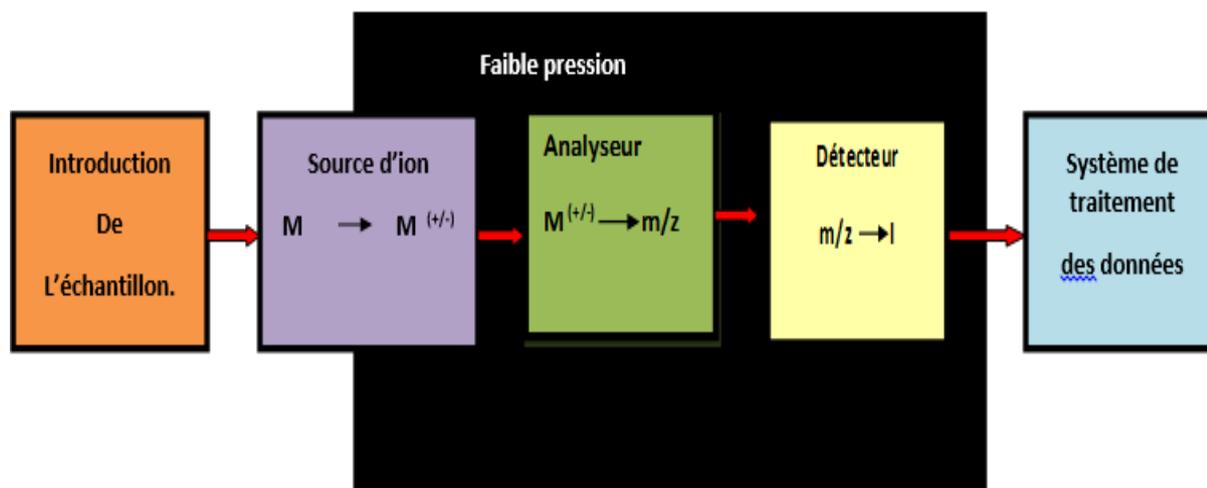


Figure 9 : Principe de fonctionnement de CG/MS.

II.4.2. Screening phytochimique :

Le but de ces analyses est de connaître la composition qualitative en métabolites secondaires des plantes. Les tests sont effectués sur la poudre du broyat et sur l'infusé de la partie aérienne de la plante

Matériels et méthodes

(*Pinus halepensis L.*) récoltées et séchées .La partie aérienne séchée a été broyée au moulin électrique (Annexe 1).

II.4.2.1. Préparation de l'infusé de la matière végétale :

- ✓ On chauffe l'eau distillé sur une plaque chauffante jusqu'à l'ébullition.
- ✓ On met 10g de la poudre végétale dans 100 ml de cette l'eau distillée et on laisse infuser pendant 15mn agité puis on filtre après refroidissement.
- ✓ Le filtrat est ajusté jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée.

II.4.2.2 Identification de quelques métabolites secondaires de *Pinus Halepensis L* :

1) Identification des anthocyanes :

Rajouter quelques gouttes d'ammoniaque ½ à 5 ml d'infusé. L'apparition d'une couleur rouge, indique la présence des anthocyanes.(Bruneton ., 1999) .

2) Identification des tanins :

À 5 ml d'infusé, rajouter quelques gouttes d'une solution de $FeCl_3$ à 5%. La réaction donne une coloration bleu noir en présence des tanins. (Préparation de réactif de Fer chlorure anhydrique à 5% : voir l'Annexe 1)(Bruneton ., 1999).

A. Les tanins catéchétiques :

15 ml d'infusé sont additionnés à 7 ml de réactif de Stisany .La réaction donne une coloration rouge en présence des tanins catéchétiques. (Préparation de réactif de stisany : voir l'Annexe 1).(Bruneton ., 1999).

B. Les tanins galliques :

À 5 ml d'infusé sont ajoutés 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de $FeCl_3$. La réaction donne une coloration bleu foncée en la présence des tanins galliques. (Bruneton ., 1999).

3) Identification Les flavonoïdes :

À 5ml d'infusé sont additionnés 5 ml d'HCL, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool iso-amylque. La réaction donne une coloration rouge orangée en présence des flavonoïdes. (Bruneton ., 1999).

4) Identification Les alcaloïdes :

Introduire 1g de poudre végétale dans un tube à essai, ajouter 10ml d'acide sulfurique (10%) agiter énergiquement pendant 2 mn et filtrer, on dernier ajouter 2 gouttes du réactif de Dragendorff. Apparition d'un précipité rouge orangé. **(Bruneton ., 1999).**

5) Identification Les glucosides :

À 2 g de poudre végétale, ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides. **(Bruneton ., 1999).**

6) Identification Les mucilages :

On introduit 1ml de l'infusé dans un tube et on lui ajoute 5ml d'éthanol absolu, l'obtention d'une précipitation floconneux indique la présence des mucilages. **(Bruneton ., 1999).**

II.5 .Etudes des activités biologiques :

II.5.1.Activité anti-inflammatoire

Selon le test de Levy a été réalisée l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle et de l'hydrolat de la plante étudiée. **(Collot ., 1972).**

Principe :

L'injection de la carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un anti-inflammatoire.

Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondant

IBUPROFENE® 200mg.

Mode opératoire :

1. Préparation de la solution de carragénine :

Pour la préparation : nous mettons 25ml d'eau physiologie dans un petit bécher, nous lui ajoutons progressivement de la carragénine (0.5g), puis nous ajustons le volume à 50ml avec de l'eau physiologie (plus quelques gouttes de tween 80 pour permettre la poudre de carragénine de dispersée dans l'eau distillée).agitation avec un vortex pour avoir une solution homogène.

Constituer 4 lots de 5 souris chacun :

Matériels et méthodes

- Un lot témoin.
- Un lot d'essai (P.H).
- Un lot d'essai (hydrolat).
- Un lot d'essai (HE après formulation).
- Un lot de référence.

- **Au temps T₀ :**

Administrer aux quatre lots suspensions suivantes :

-Lot témoin : chaque souris reçoit 0.5ml d'eau distillé.

-Lot d'essai (P.H) : chaque souris reçoit 0.5ml du produit à tester l'huile essentielle de *Pinus halepensis L* à la dose active bibliographique.

-Lot de l'hydrolat : chaque souris reçoit 0.5ml du produit à tester l'hydrolat de *Pinus halepensis L* à la dose active bibliographique.

-Lot de référence : chaque souris reçoit 0.5ml du produit de référence Ibuprofène® 200mg à la même dose active.

- **Au temps T₀+30mn :**

Injecter la solution de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche sous un volume de 0.1ml aux souris.

- **Au temps T₀+4h :**

-Sacrifier les animaux par rupture de la nuque ensuite couper les pattes postérieures à hauteur de l'articulation et les peser sur une balance analytique.

Expression des résultats :

-Calculer les moyennes arithmétiques des poids de la patte gauche et la patte droite pour chaque lot.

-Calculer le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (%d'œdème) par la formule suivante :

$$\%d' oedème = \frac{\text{moyenne des poids de la patte gauche} - \text{moyenne des poids de patte droite}}{\text{moyenne des poids de patte droite}} * 100$$

Matériels et méthodes

-Calculer le pourcentage de réduction de 'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins.

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ d'œdème témoin}} * 100$$

II.5.2. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'hydrolat des aiguilles de *Pinus halepensis L* a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide (méthode validée inspiré de la méthode des disques ou d'antibiogramme) afin de déterminer la sensibilité ou non des différentes souches vis-à-vis à l'HE et l'hydrolat.

- **Mode opératoire :**
- **Repiquage des souches :**
 - Afin d'obtenir des cultures jeunes de 24h, les souches conservées ont été repiquées par ensemencement en striées sur gélose nutritive pour les bactéries et milieu sabouraud pour les souches fongiques, puis incubées dans l'étuve pendant 24h à 37 °C pour les bactéries et pendant 48h à 25 °C pour les levures .
- **Enrichissement des bactéries :**
 - 5ml de TSB ont été prélevés et mis dans deux tubes à essai. quelques colonies de la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* ont été prélevées et mises dans un des deux tubes à essai .La même opération a été réalisée pour la souche *Bacillus subtilis*. La suspension est homogène et incubée à 35°C pendant 24h.
- **Préparation de la 1^{ère} couche de milieu :**
 - Faire fondre le milieu MH et SAB dans un bain marie 95°C et laisser refroidir jusqu'à 45°C.
 - Verser aseptiquement la 1^{ère} couche dans les boîtes de pétri d'un diamètre de 9cm à raison de deux boîtes par souche étudiée.
 - Laisser refroidir et solidifier (environ 30min) sur paille.

Matériels et méthodes

➤ Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure et jeune de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures préparer une suspension ; on prélève 3 à 5 colonies à l'aide d'une pipette pasteur scellée, quelque colonie bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger la pipette pasteur dans 5ml d'eau distillé stérile.
- Agiter pendant quelque secondes pour bien homogénéiser la suspension.
- La lecture de la densité optique est effectuée.

➤ Préparation de la 2^{ème} couche du milieu :

- Remplir des flacons stériles avec 50ml de MH pour les bactéries et avec 50ml de SAB pour les levures pour chaque souche.
- Ensemencer les milieux de culture avec 200µl de chaque suspension dans chacun des flacons.
- Agiter manuellement les flacons, puis verser rapidement 5ml de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boites contenant déjà la première couche solidifiée.
- Etaler rapidement la seconde couche, en faisant pivoter la boite sur elle-même pour avoir une surface uniforme puis laisser solidifier sur la paillasse.

➤ Dépôt des disques d'aromatogrammes :

- Prélever les disques stériles, fabriqués à partir du papier « wattman » avec un diamètre 9mm à l'aide d'une pince stérile.
- Imbiber avec l'huile essentielle et d'autre part l'hydrolat de la plante.
- Déposer les disques sur la deuxième couche qui forme un tapis bactérien.
- Laisser diffuser pendant 30min sur la paillasse.
- Incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures la même l'opération a été fait pour l'hydrolat. (Figure 10).

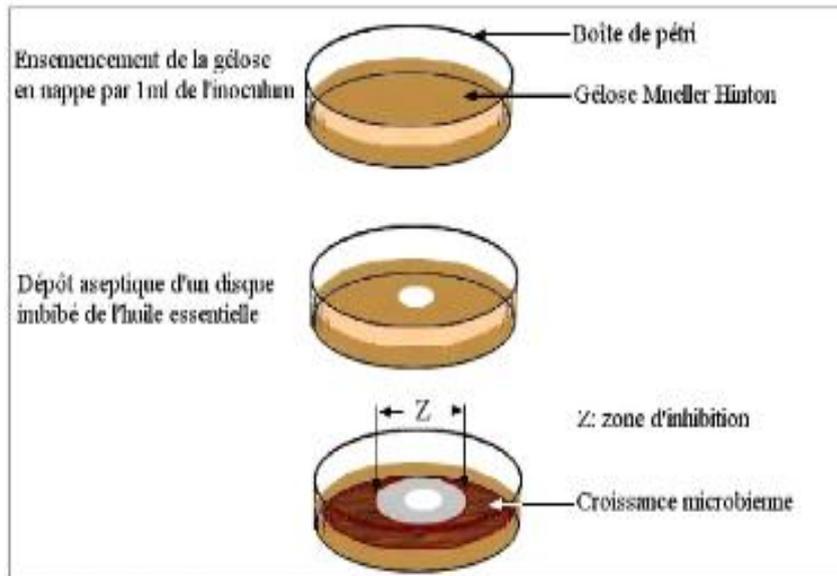


Figure 10: Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Zaiki, 1988).

➤ Lecture

Les résultats sont notés le lendemain de l'incubation pour les bactéries et deux jours après pour les levures, en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques ou zones d'inhibition.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Meena et sethi(1994)

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la **ZI** ≥ 28 mm.
- Modérément inhibitrice : $16\text{mm} < \text{ZI} < 28\text{mm}$.
- Légèrement inhibitrice : $10\text{mm} < \text{ZI} < 16\text{mm}$.
- Non inhibitrice : $\text{ZI} < 10\text{mm}$.

II.5.3. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante a été déterminée par la méthode des radicaux de balayage DPPH, selon le protocole décrit par Molyneux, (2004) et modifié par Nait bachir et al, (2017). En bref, une solution de DPPH à 0,004 g pour 100 ml de méthanol a été préparée. Environ 3 ml de la solution de DPPH ont été mélangés à 1 ml de solution à analyser (de 0.5 à 5 mg / ml).

Matériels et méthodes

Mode opératoire :

✓ Préparation de la solution méthanolique à DPPH :

-Peser 4 mg de DPPH et versé 100 ml de Méthanol dans une fiole pour avoir une solution méthanolique de DPPH à 0,004% (Solution mère).

✓ Préparation des solutions méthanoliques (différentes concentrations) de huiles essentielles, des hydrolats et vit C :(0.5, 0.75, 1, 2.5 et 5 mg/ml) :

-Les 1^{er} étape de ce teste consiste a mettre 0.5mg de l'extrait (HE et hydrolat) addition à 1 ml de méthanol pour avoir la solution. La même opération est répétée pour les différents concentrations (0.75, 1, 2.5et 5 mg/ml).

-Pour la 2^{ème} étape, 1ml de chacune des solutions Méthanoliques des extraits (l'huile essentielle et l' hydrolat) sont mélangées avec 3 ml d'une solution Méthanoliques de DPPH (0,004 %) recouverte les tubes avec Papier aluminium. Le même protocole est réalisé pour la vitamine C.

- Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance de chaque solution a été mesurée à 517 nm à l'aide du spectrophotomètre SHIMADZU UV – visible (Double Monochromateur UV-2700, Tokyo, Japon). (Le blanc est une solution de DPPH). On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydant pour la vitamine C , pour l'huile essentielle et l'hydrolat (Pourcentage d'inhibition, l'index IC₅₀).

✓ Détermination du pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ :

Selon **Sharififar et al. (2007)** L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I \% = \frac{A_0 - A_s}{A_0} * 100$$

Avec :

I%= le pourcentage de l'activité antioxydant.

A0 = l'absorbance de la solution de DPPH.

AS = l'absorbance de la DPPH.

Matériels et méthodes

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydant.

La cinétique des réactions de l'huile essentielle, de l'hydrolat et de la vitamine C avec le DPPH• a été inscrite à chaque concentration examinée. Les concentrations en huile essentielle, en l'hydrolat et en vitamine C en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC₅₀. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50 %.

II .6. Formulation et caractérisation d'une nano-émulsion à effet anti-inflammatoire à base de l'huile essentielle de *Pinus .halepensis L.*

II.6.1. Formulation de la nano émulsion

- ✓ Etape 1 (Préparation de la phase aqueuse) : la b-cyclodextrine 5%, l'arginine 5% et la gomme xanthane 1% ont été dissoutes dans de l'eau bidistillée avec chauffage à 40°C pendant 2H.
- ✓ Etape 2 (Formation de l'émulsion primaire) : 2,5ml de l'huile essentielle de *Pinus halepensis L* sont dispersés dans la phase aqueuse (à 5% p/p) en utilisant un Ultra-Turrax (T25 IKA Labortechnik, Allemagne) à 24000 tr/min pendant 15 minutes.
- ✓ Etape 3 (Préparation de la nanoémulsion) : l'émulsion primaire a été soumise à une sonication à l'aide d'un bain à ultrasons (Ultrasonics, USA) à une fréquence de 20 kHz et une puissance de 750W (Nait bachir ., 2018). La composition de la formulation est donnée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composition de la nano-émulsion. (Nait bachir ., 2018)

Composition	Quantité
Huile essentielle	5%
β-cyclodextrines	5%
Arginine	5%
Gomme xanthan	1%
Eau	84%

II.6.2. Analyse de la formulation par granulométrie laser

La distribution granulométrique des gouttelettes a été déterminée à l'aide d'un granulomètre laser de type Nanotrak TM250 (Microtrac Inc, PA, USA). La répartition des tailles de gouttelettes a été caractérisée en termes de diamètre moyen de la distribution volumique en mesurant la lumière diffusée (173°), l'échantillon a été dilué à un rapport de 1:100 avec de l'eau bidistillée. (Duan .,et al (2008)). (Voir annexe II)

Le diamètre moyen de la distribution volumique «Md» a été calculé par l'équation suivante :

Où «V_i» est le pourcentage de volume entre les tailles de gouttelettes et «d_i» le diamètre des gouttelettes.

$$Md = \frac{\sum V_i d_i}{\sum V_i}$$

II.6.3. Analyse du potentiel zêta ζ

Le potentiel zêta de la nano-émulsion a été déterminés à l'aide de l'appareil Nanotrak (Microtrac Inc, PA, USA) et calculés en utilisant l'équation de Smoluchowski (Thielbeer., et al 2011) .

$$\zeta = \frac{4\pi\eta v}{\varepsilon \frac{U}{L}}$$

Où «U» est la tension et «L» est la distance entre deux électrodes, «ε» et «η» sont respectivement la constante diélectrique et la viscosité de l'eau pure et «v» la vitesse mobile des gouttelettes de l'huile essentielle dans le champ électrique.

II.6.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire:

L'activité anti inflammatoire de la nano-émulsion a été testée sur les souris, en utilisant le modèle de l'œdème de la patte induite par la carragénine ; le Protocol a été préalablement décrit dans la section (II.5.1).

III.1. Détermination de la teneur en eau

Les résultats de la teneur en eau de l'espèce sont consignés dans la figure 11

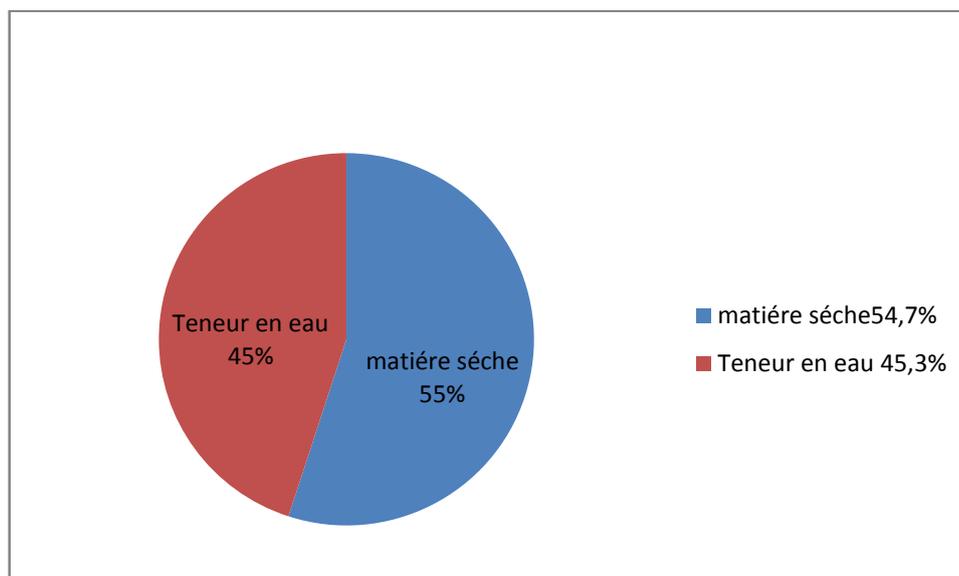


Figure 11 : Teneur en eau et de la matière sèche de *Pinus halepensis L*

La teneur en eau obtenu en pourcentage est de 45.3% ce résultat nous servira pour le calcul des rendements des huiles essentielles du matériel végétal frais.

III.2. Rendement en huile essentielle

Les aiguilles du *Pinus halepensis L* de chréa ont fourni un rendement de (0.83%) d'huile essentielles .Ce dernier est relativement supérieur à ceux obtenus dans les travaux menés par **Boukhalfa ,(2008)** qui mentionne un rendement de (0.66 %) pour la région de Blida, Cependant, il demeure proche à celui de la région d'El Hamdania (0.80 %) et inférieur par rapport à celui de la région de chréa (1%) .

Certains auteurs indiquent que la qualité et la quantité des huiles essentielles sont influencées par des facteurs environnementaux spécifiques, comme la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents (**Garnero, 1991 ;Bruneton ,1993 ;Bureton ,1999**).

III.3. Composition chimique des extraits

III.3.1. Analyse de l'huile essentielle par CG/SM

Le chromatogramme est montré dans le tableau V et la figure 12.

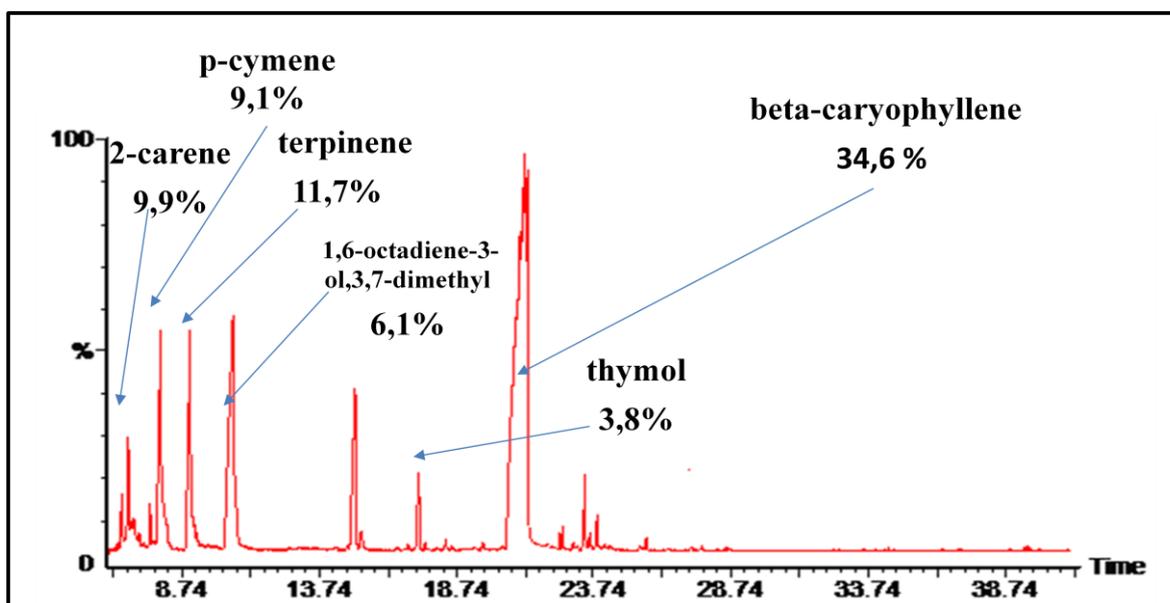


Figure 12 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* L.

L'analyse de CG/SM nous a permis d'identifier 20 composés qui correspondent à 87.9% de la composition totale de l'huile essentielle du *Pinus halepensis* L. Le composé majoritaire de cette huile essentielle est le beta-caryophyllene (34.6%). Il existe d'autres composés qui présentent des teneurs plus ou moins importantes : gamma-terpinene (11.7%), 2-carene (9.9%), p-cymene (9.1%), 1,6-octadiene-3-ol,3,7-dimethyl (6.1%), thymol (3.8%). Les autres constituants ont des teneurs faibles inférieures à 1% : 4-epi-cubedol (0.1%) caryophyllene-oxide (0.4%) alpha-cadinol (0.6%) cis-alpha-copaene-8-ol (0.4%).

Les études réalisées sur *Pinus halepensis* cueillies à Sidi fradj présentent les composés majoritaires : alpha-caryophyllène (26.6%), allo-aromadendrene (12.5%), and alpha-humulene (4.3%). (Dob et al., 2002 cité par Benaziza., 2017).

III.3.2. Screening phytochimiques :

Les tests de screening phytochimiques de la poudre, de l'infusé et de l'hydrolat du *Pinus halepensis* L ont permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires représentés dans le tableau suivant :

Résultats et discussion

Tableau 4 : Résultats de screening phytochimiques des aiguilles du *Pinus halepensis L.*

Métabolites	Résultats (HE)	Résultats (Hydrolat)	Réaction positive
Glucoside	+	+	Rouge brique ensuite violette.
Alcaloïde	-	-	Ne change pas la couleur.
Mucilage	+	+	L'obtention d'une précipitation floconneuse indique la présence du mucilage.
Anthocyanes	+	+	Rouge.
Tanin	+	+	Bleue Noire.
Tanins catéchétiques	+	+	Rouge.
Tanins galliques	+	+	Bleue foncé.
Flavonoïdes	+	+	Rouge orangé.

Les résultats des tests préliminaires démontrent que les aiguilles et l'hydrolat de *Pinus halepensis L.*

Renferme la majorité des classes de métabolites secondaires testées dont les Glucosides, les Mucilages, les Flavonoïdes, les Anthocyanes, les Tanins, les Tanins catéchétiques et les Tanins galliques. Nous montrons que l'ensemble des métabolismes secondaire cité précédemment sont présentes au niveau des aiguilles et de l'hydrolat de pin d'Alep exception faite pour les anthocyanes qui sont faiblement présent au niveau de l'hydrolat.

III.4. Etudes des activités biologiques :

III.4.1. Activité anti inflammatoire

Le but de ce test est la mesure de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle et de l'hydrolat de l'espèce étudiée. Pour cela nous avons déterminé le pourcentage d'œdème provoqué suite à une inflammation des pattes de souris par un produit irritant à base de la carragénine. L'application par la suite de l'huile essentielle et l'hydrolat de la plante et du produit de référence Ibuprofène[®] aux lots de souris correspondants permettra d'évaluer

Résultats et discussion

l'effet anti inflammatoire des extraits utilisés.

La comparaison du taux de réduction de l'œdème des pates après application de doses égales du produit à tester et celui du produit de référence correspondant, est réalisée par rapport à un témoin.

Le tableau 5 ci-après représente les résultats d'œdème des plantes étudiées exprimé en pourcentage d'œdème par rapport au témoin et au produit de référence.

Tableau 5 : Pourcentage de l'augmentation de l'œdème.

Lots	Témoin	Ibuprofène [®]	HE de <i>Pinus halepensis L</i>	Hydrolat de <i>Pinus halepensis L</i>
% d'œdème	46.66	22.04	17.35	24.06

Nos résultats sont présentés sous formes d'histogramme (**Figure 13**).

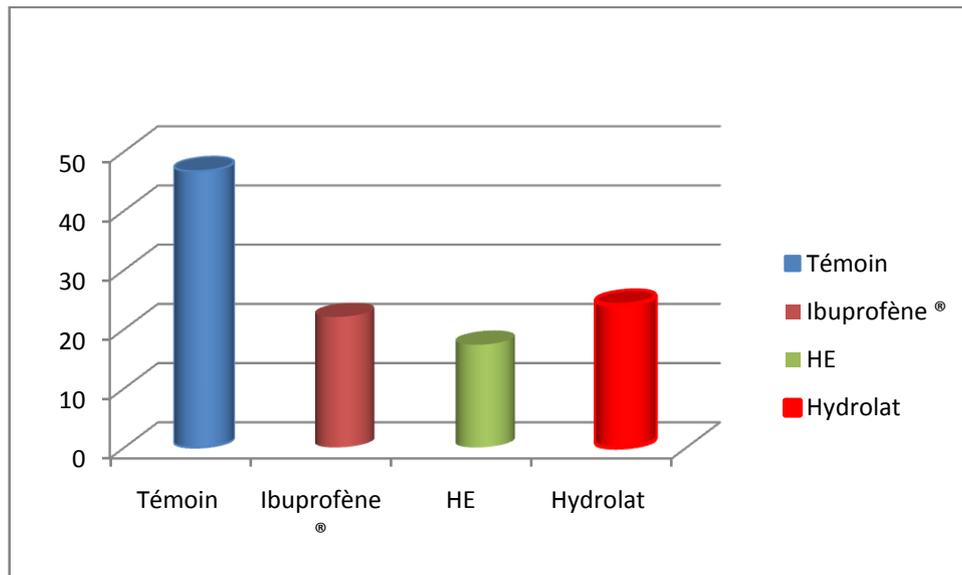


Figure 13 : Pourcentages de l'augmentation de l'œdème.

Selon les résultats montrés dans la figure 13, nous constatons que le lot traité par l'huile essentielle, présente le pourcentage le plus faible de l'augmentation de l'œdème (17.35%). L'hydrolat présente un pourcentage plus élevé (24.06%) par rapport à celui traité par Ibuprofène[®] qui présente un pourcentage de (22.04%). La valeur la plus élevée est obtenue pour le témoin négatif avec (46.66%).

Résultats et discussion

Le tableau 6 représente les résultats de la réduction de l'œdème exprimé en pourcentage

Tableau 6 : Pourcentage de la réduction de l'œdème.

Lots	Témoin	Ibuprofène [®]	HE de <i>Pinus halepensis L</i>	Hydrolat de <i>Pinus halepensis L</i>	HE formulation
% réduction de l'œdème	00.00	52.76	62.81	48.43	84.64

Nos résultats sont présentés sous formes d'histogramme (Figure14).

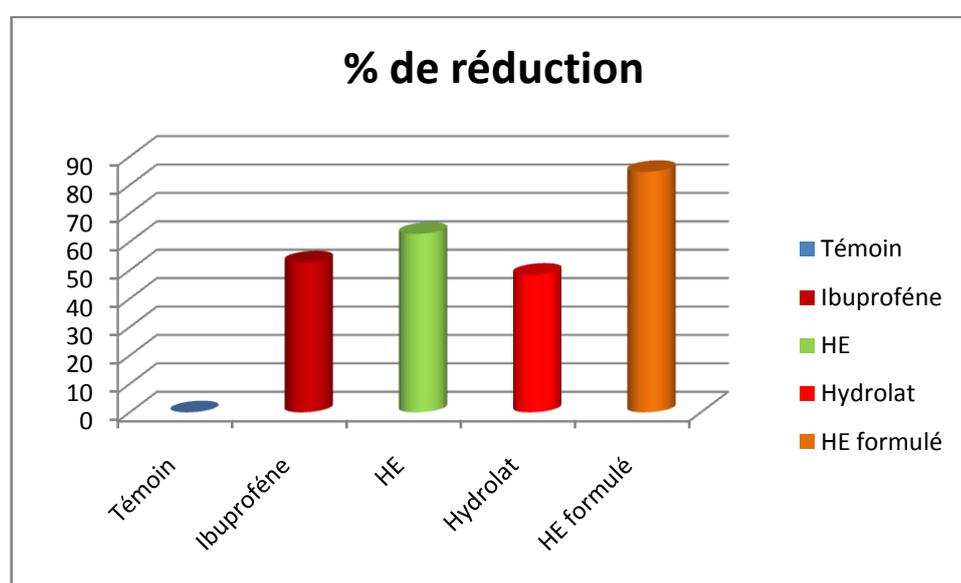


Figure 14: Pourcentages de réduction de l'œdème.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle et de l'hydrolat de *Pinus halepensis L* . montrent que notre plante présente un effet anti-inflammatoire plus important comparativement à celui du produit de référence Ibuprofène[®] .

Selon la figure 14 nous constatons que l'HE des aiguilles de *Pinus halepensis L* à réduit l'œdème induit par la carragénine à 1 %, d'une façon appréciable (62.81%) par rapport au produit de référence Ibuprofène[®] qui présente un pourcentage (52.76%).et à l'hydrolat qui présente un faible pourcentage de réduction de l'œdème (48.43%).

Résultats et discussion

Selon **OKoli et al.(2007)**, l'injection de la carragénine par voie sous aponévrose plantaire induit une accumulation du liquide conduisant à la formation d'un œdème qui est caractéristique de l'inflammation aigue. L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum au bout de 3 heures après l'injection de la carragénine (**Russo-Marie et al ., 1998**).

L'injection de la carragénine aux animaux provoque une inflammation locale causée par une lésion tissulaire qui résulterait de l'action des prostaglandines et de l'histamine produites. Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la zone d'inflammation. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (**Devulder et al.,2002 ; Rousselet et al .,2005**).

La formulation présente un pourcentage d'inhibition de l'œdème de (84.64 %) Cette valeur est supérieure à celle de l'huile essentielle pure (62.81%) voir figure 19. Cette augmentation est principalement due à deux mécanismes différents, le premier est l'augmentation de l'absorption de l'huile essentielle par la muqueuse intestinale (grâce à la petite taille des gouttelettes de l'huile essentielles) et le 2^{ème} est l'augmentation de la solubilité de l'huile essentielle dans le sang (grâce à la formation des complexes d'inclusion entre le β -cyclodextrine et les composés de l'huile essentielle), ce mécanisme a été proposé dans une formulation antidiabétique par (**Nait bachir et al ., 2018**) une autre étude a également montré l'augmentation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle. **Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011)**

Résultats et discussion

III.4.2. Activité antimicrobienne

Le résultat de l'effet antimicrobien des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* L Sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Résultat des testes d'inhibition de l'activité antimicrobienne de *Pinus halepensis* L.

Souche testées	ZI (mm) HE	Interprétation	ZI(mm) (Hydrolat)	Interprétation	Norme MEENA et SETHI (1994)
<i>Escherichia coli</i>	<9	R	13	S	Fortement inhibitrice ZI >28mm
<i>Bacillus subtilis</i>	<9	R	<9	R	
<i>Staphylococcus Aureus</i>	12.5	S	<9	R	Modérément Inhibitrice 16mm<ZI>28mm.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<9	R	14.5	S	Légèrement inhibitrice 10mm<ZI>16mm
<i>Candida albicans</i>	12.5	S	<9	R	
<i>Saccharomycète cerevisiae</i>	12.75	S	<9	R	Non inhibitrice ZI <10mm

D'après le tableau 7 l'huile essentielle de *Pinus halepensis* L a montré une activité légèrement inhibitrice sur *Staphylococcus aureus* Gram+ (12.5 mm). Toute fois elle semble non inhibitrice sur les autres souches : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Les deux levures *Candida albicans* et *Saccharomycète cerevisiae* sont légèrement sensible (12.5mm) et (12.75 mm) respectivement.

Ces résultats sont en accord avec les données de (Morris et al ., 1979), qui notent que l'huile essentielle de *Pinus halepensis* L a montré une activité modérée sur *Staphylococcus aureus*.

Selon Nedorostova L et al.(2009) , l'huile essentielle de *Pinus halepensis* L est plus active contre les germes gram positifs .il semblerait que les bactéries gram négatives typiques sont plus résistantes.ces résultats sont confirmés par plusieurs travaux (Canillac , 2001 ; Hussain et al ., 2008).

Résultats et discussion

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 (**Lawrence ,1993 ; Dorman, Deans, 2000**). Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules présentes en faibles proportions dans les huiles essentielles (**Belaicheetal ., 1995 ; Tzakouet al ., 2007**)

Les huiles essentielles de *Pinus halepensis L* ont une importante activité antimicrobienne, révélée par le test de diffusion sur disque contre 11 bactéries avec des zones maximales d'inhibitions pour les espèces suivantes : *Enterococcus faecalis*, *Lysteria monocytogene*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* (**Macchioni et al., 2002**). De plus les huiles extraites des feuilles de *P.halpensis* ont montré aussi une forte activité antifongique contre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Niger*, *Fusariumoxysporum*, et *Rhizopusstolonifer* (**Fekih et al., 2014**).

Des études on montré une activité antimicrobienne sur les souches *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeroginosa*, et *Escherichia coli* par la présence du Thymol dans l'huile essentielle .(**Franchome et al .,2001**)

Nous rappelons que notre l'huile essentielle contient 3.8% du thymol malgré cela, nos résultats ont montré l'absence de l'activité antibactérienne sur ces souches .Cela peut être expliqué par l'absence d'autres composés qui agissent une synergie avec le thymol .

D' autre part des composés des huiles du pin d'Alep (β -caryophyllène, l' α -pinène, le β -myrcène et l' α terpinolène) sont caractérisées par une forte activité antibactérienne sur des souches antibiorésistantes responsables d'infection nosocomiale dont les *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeroginosa*, et *Escherichia coli* (**Sadou, et al., 2015 cité par Benaziza ., 2017**).

Le résultat de l'effet antimicrobien de l'hydrolat des aiguilles de *Pinus halepensis L*

D'après le tableau XI l'hydrolat de *Pinus halepensis L*. a montré une activité légèrement inhibitrice sur *Escherichia coli* Gram - (13 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* Gram - (14.5mm) . Toute fois elle semble non inhibitrice sur les autres souches : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* , *Candida albicans* et *Saccharomycète cerevisiae*.

La forte activité bactériostatique des hydrolats de sarriette et d'origan est due à la présence de carvacrol et de thymol, qui sont deux phénols mono terpéniques connus pour leur activité antibactérienne. (**Farag et al., (1989) ; AL-Turki (2007)**) ces auteurs ont indiqué

Résultats et discussion

que les hydrolats de thym, menthe poivrée, poivre noir et ail présentent des propriétés antibactériennes contre *B. subtilis* et *S. enteritidis*. Par la suite, Selon **Hussein et al. (2011)** en étudiant l'effet antibactérien de certains hydrolats extraits à partir du basilic (*O. basilicum*), du thym (*T. schimperi*), de Cardamome (*E. cardamon*), du clou de girofle (*S. aromaticum*) et de cannelle (*C. zeylacinum*) ont prouvé leur efficacité pour inhiber certaines bactéries telles que *S. aureus*, *E. coli* et *S. typhi*.

Des chercheurs de l'Université d'isparta en Turquie se sont intéressé au potentiel antibactérien d'hydrolats issus d'épices abondamment utilisées en alimentation pour aromatiser Ses préparations culinaires (**Sagdiç et al., 2003**). Plusieurs hydrolats d'épices de Turquie ont été testés tels que ceux de romarin (*Rosmarius officinalis L.*), de basilic (*Ocimum basilicum L.*), d'origan (*Origanum vulgare L.*) ou encore d'anis (*Pimpinella anisum L.*). L'étude a été réalisée sur plusieurs bactéries pathogènes (*Escherchia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphilococcus aureus*, etc.). Les hydrolats de thym « noir » (*Thymbra spicata L.*), de cumin (*Cuminum cyminum L.*) puis d'anis (*Pimpinella anisum L.*) ont également montré une activité intéressante contre certaines bactéries. (**Deans et al., 1990; Farag et al., 1989**).

Résultats et discussion

III.4.3. Activité anti oxydant

Les résultats de l'activité antioxydant sont montrés dans les figures suivantes :

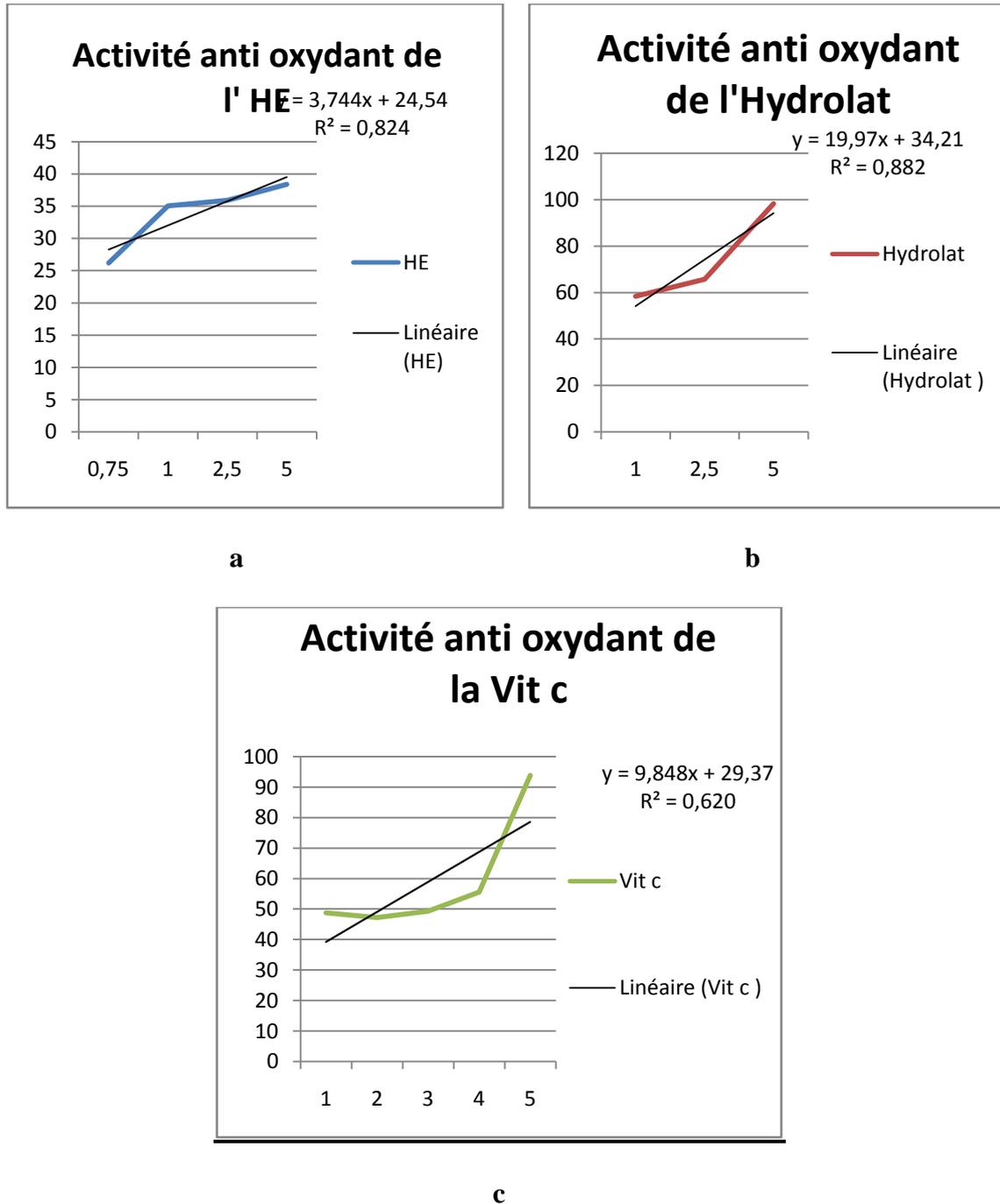


Figure 15: les résultats de l'activité anti oxydant des aiguilles de *Pinus halepensis*.

a= Huile essentielle, b = Hydrolat, c = vitamine c .

Résultats et discussion

D'après les figures, nous pouvons dire que l'huile essentielle et l'hydrolat sont donnés d'une activité antioxydant plus ou moins importante.

Les résultats de l'IC₅₀ sont montres dans la figure 16 :

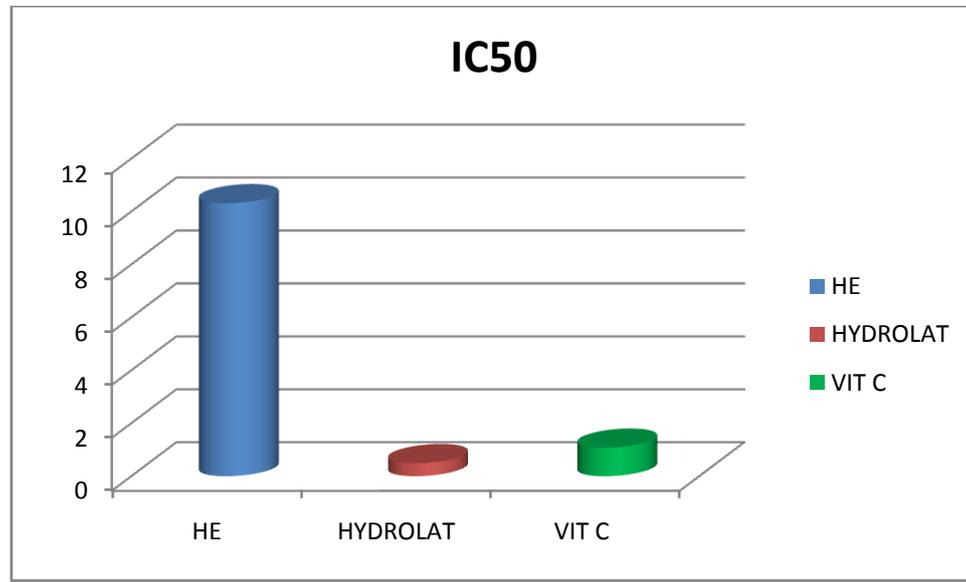


Figure 16 : les résultats de l'IC₅₀

Les résultats montrés dans la figure 16, nous permettent de constater que l'hydrolat possède une activité antioxydant importante $IC_{50} = 0.487 \pm 0.958$ (mg/ml) et la Vit C avec une $IC_{50} = 1.071 \pm 0.925$ (mg/ml). Par contre, l'huile essentielle n'a aucune activité antioxydant montrant une IC_{50} de 10.311 ± 0.543 (mg/ml).

Selon (Seladji., 2014) ont travaillé sur huiles essentielles des trois espèces de Pinus

(*P.pinea*, *P.pinaster* et *P.halepensis*). Selon l'auteur aucune activité antioxydant n'a été notée pour l'huile essentielle de *P.halepensis* .

En général, les interactions synergiques entre les différents constituants d'une HE sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important (Vardar-Ünlü G.,2003).

La capacité des hydrolats à empêcher l'oxydation a été vérifiée par certains chercheurs. Des hydrolats comme ceux de *S. aromaticum*, *T. vulgaris* et *L. officinalis* se sont montrés très

Résultats et discussion

efficaces en tant qu'antioxydants (Aazza et al., 2012). De même, les hydrolats issus de fleurs et de racines de *Daucus muricatus L.* ont révélé un fort potentiel antioxydant à de faibles concentrations (Dib et al., 2015). En revanche, Zimoch-Korzycka et al. (2016) ont trouvé que l'hydrolat de *L. angustifolia* a présenté une faible activité antioxydante due à leur pauvreté en principes actifs.

III.5. Formulation et caractérisation de la nano-émulsion

La nano émulsion obtenu présente un aspect légèrement trouble qui vire vers la couleur blanche, c'est un signe que les gouttelettes de l'huile essentielle dispersé dans la phase contenu présentent de petite taille contrairement à l'émulsion classique (crème) qui ont un aspect opaque et blanchâtre. La nano-émulsion présente une odeur caractéristique du principe actif (l'huile essentielle *Pinus halepensis L*) et un aspect très léger, une faible viscosité et un étalement très facile.

L'analyse par la granulométrie laser nous a permis de mesurer le diamètre moyen des nano- gouttelette qui est de l'ordre de 216,08 nm .La distribution granulométrique a été représenté dans la figure 17, son allure est quasiment une gaussienne mono-disperse.

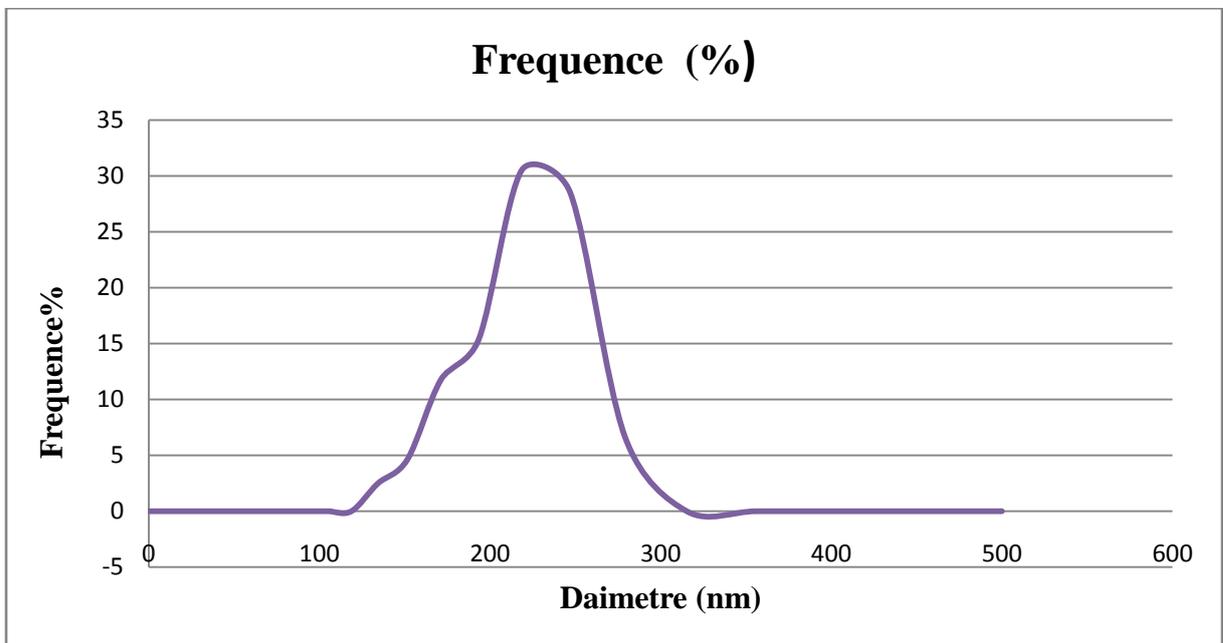


Figure 17 : les résultats représentent l'analyse de l'huile essentielle par granulométrie laser.

Résultats et discussion

L'analyse du potentiel zêta nous renseigne sur le nuage électrique qui entoure les nanogouttelettes est donc sur la stabilité de la formulation, sa valeur est de l'ordre de 81,26 mV, l'évolution de potentiel zêta a été montré dans la figure 18. Cette valeur nous confirme que notre formulation est stable dans le temps, effectivement cette valeur positive de potentiel zêta est due à l'acide aminé chargé positivement (l'arginine).

Disalvo, E. A., & Bouchet, A. M. (2014).

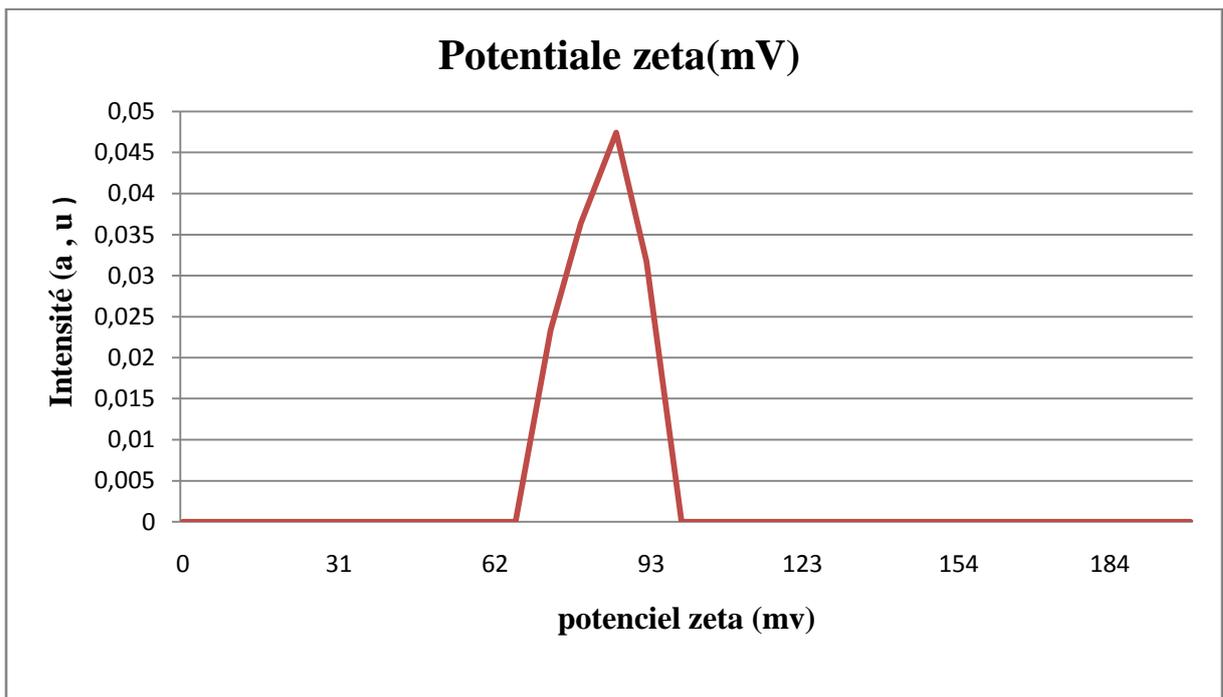


Figure 18 : les résultats représentent l'analyse du potentiel zêta.

Conclusion

Ce travail a porté sur l'étude de l'espèce *Pinus halepensis L.* de la région de chréa de BLIDA à savoir les analyses phytochimique, la caractérisation par CG/SM, les tests anti inflammatoire, antimicrobienne, anti oxydant et la formulation nano émulsion de l'huile essentielle.

L'extraction par hydro distillation de l'huile essentielle des aiguilles a permis d'obtenir un rendement de (0.83%).

La composition chimique de cette l'huile essentielle a fait l'objet d'une analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Cette analyse nous a permis d'identifier 20 composés qui correspondent à 87.9% de la composition totale de l'huile essentielle du *Pinus halepensis L.* Les composés majoritaires de cette l'huile essentielle sont : beta-caryophyllène (34.6%), gamma-terpinène (11.7%), 2-carene (9.9%), p-cymène (9.1%), 1,6-octadiène-3-ol,3,7-diméthyl (6.1%), thymol (3.8%).

Des aiguilles de l'espèce étudiée ont été analysées par un screening phytochimique. Les résultats obtenus ont révélé la présence des Glucosides, les Mucilages, les Tanins catéchétiques, les Flavonoïdes, les Anthocyanes, les Tanins et les Tanins galliques. Ces différentes substances actives sont aussi présentes chez l'hydrolat.

L'étude de l'activité anti inflammatoire des huiles essentielles et des hydrolats (selon le **test de Levy**) réalisé sur des souris a montré un effet important de cette espèce comparée au produit de référence Ibuprofène®.

L'évaluation de l'activité anti microbienne de l'huile essentielle et de l'hydrolat a été effectuée sur 4 souches de bactérie à Gram- et Gram+ et deux levures. Les résultats obtenus ont montré que notre huile essentielle est légèrement inhibitrice sur des souches *Staphylococcus aureus* Gram +, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, elle s'avère non efficace vis-à-vis de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Alors que l'hydrolat de cette espèce a montré une activité légèrement inhibitrice sur *Escherichia coli* Gram - et *Pseudomonas aeruginosa* Gram -. Toute fois elle semble non inhibitrice sur les autres souches : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*.

L'activité antioxydant de l'huile essentielle et de l'hydrolat est également, testée par la méthode des radicaux de balayage DPPH. Les résultats obtenus montrent l'existence d'un pouvoir antioxydant plus important pour l'hydrolat.

Conclusion

Le produit obtenu par la formulation de l'huile essentielle (nano-émulsion) présente un pourcentage d'inhibition de l'œdème de (84.64 %) Cette valeur est supérieure à celle de l'huile essentielle naturelle pure (62.81%).

Il est important donc de pour suivre les travaux concernant cette plante pour une éventuelle formation médicamenteuse à base de *Pinus halepensis L.*

Ce travail ouvre la voie à d'autre perspective, il serait nécessaire également :

- ✓ De comprendre le mode d'action des huiles essentielles pour une bonne gestion de leur exploitation et de leur utilisation dans les différents domaines (pharmaceutique, cosmétique, alimentaire, industriels... etc.).
- ✓ L'analyse chimique des hydrolats par HPLC, pour comprendre leur effets positifs des différentes activités biologiques

Annexe 1 : matériel de laboratoire utilisé

Petit matériel et consommable

- Bec bunsen.
- Becher.
- Bol en inox.
- Boîtes de pétri stériles à usage unique.
- Burette graduée.
- Disque en papier absorbants.
- Entonnoir.
- Erlenmeyer.
- Etiquettes.
- Filtre.
- Gants.
- Gaze.
- Flacons stériles.
- Fiole jaugée.
- Micropipette.
- Pied à coulisse.
- Papier aluminium.
- Pince.
- Pipettes pasteur.
- Pipettes graduées.
- Pissette.
- Portoir pour tubes.
- Seringue stériles en plastique à usage unique.
- Tubes à essai en verre à vis et à fond plat.

Réactifs et produits utilisés

- Acétate de sodium.
- Acide sulfurique.
- alcool iso-amylque.
- Ammoniaque.
- Arginine.
- Carragénine.

- Dragendorff.
- Eau distillé.
- Eau bidistillé.
- Eau physiologie.
- Ethanol.
- FeCl₃.
- Formol.
- Gamme xanthane.
- Gélose nutritif.
- HCL.
- Ibuprofène.
- Méthanol.
- Miller Hinton.
- Sabouraud.
- TSB.
- Twéen80.
- Vit C.
- βCD.

Appareillage

- Agitateur vortex.
- Autoclave.
- Bain Marie.
- Balance analytique.
- Balance de précision.
- Centrifugeuse.
- Clevenger.
- Eau physiologique.
- Etuve.
- plaque chauffante.
- Robot broyeur.
- Rota-vapeur.
- Spectrophotomètre UV-Visible.

- Ultrason.
- Analyseur de nanoparticule à diffusion de lumière DLS (Nanotrac).

Préparation des réactifs

A. Réactif de Fer chlorure anhydrique à 5% :

10g de FeCl_3 + 200ml d'eau distillé (**BRUNETON J., 1999**)

B. Réactif de Stiansy :

10ml de formol à 40% + 5ml d'HCL concentré (**BRUNETON J., 1999**)

Annexe 2



Figure 19 : *Pinus halepensis*.



Figure 20 : Les souris pour l'expérimentation.



Figure 21 : Administration par gavage.



Figure 22 : Mesure l'œdème.



Figure 23 : Injection de la carragénine.



Figure 24 : Pied à coulisse.



Figure 25 : Sacrifier les souris.



Figure 26 : Coupure des pattes .



Figure 27: Préparation de l'infusé.



Figure 28 : Screening phytochimique .



Figure 29: Solution Méthanoliques de DPPH.



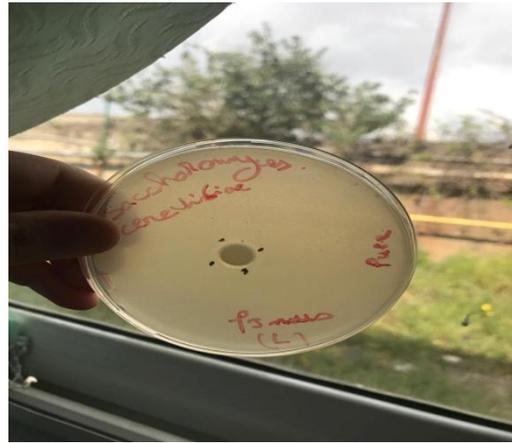
Figure 30 : Différentes concentrations des Solution Méthanoliques.



Figure 31: Spectrophotomètre SHIMADZU UV-visible.



S. aureus



S. cerevisiae



C. albicans



P. aeruginosa



E. coli

Figure 32 : L'activité inhibitrice de l'HE et de l'hydrolat de *Pinus halepensis* L.

Glossaire

Antibiogramme : Examen bactériologique qui permet d'apprécier la sensibilité ou la résistance d'une bactérie vis-à-vis des antibiotiques.

Anti-inflammatoire : Ce dit d'un produit ayant la propriété de diminuer l'inflammation.

Antiseptique : agent d'un médicament propre à prévenir les infections.

Biosynthèse : la formation de substances par un être vivant ou son symbiote, dans son milieu interne ou dans les excréta que sont le mucus, les coquilles des œufs ou des mollusques, L'écorce, etc.

Carragénine : Muco-polysaccharide sulfaté extrait d'une algue mariné.

Cellules glandulaires : cellule spécialisée qui libère des substances (comme du mucus, des hormones et des liquides lubrifiants) dans le corps.

Cuticule : la couche externe qui recouvre et protège les organes aériens des végétaux, des champignons et les organes de certains animaux.

Cytoplasme : partie de la cellule qui entoure le noyau.

Dragendorff : un réactif utilisé pour mettre en évidence les alcaloïdes notamment en pharmacognosie.

Héliophiles : une espèce végétale ayant d'importants besoins en lumière pour se développer.

IBUPROFENE® : la dénomination commune internationale de l'acide 2-[4-phényl]propanoïque. Il s'agit de la substance active d'un médicament AINS utilisé pour soulager les symptômes de l'arthrite, de la dysménorrhée primaire, de la pyrexie ; et comme analgésique, spécialement en cas d'inflammation.

l'eau bidistillée : est terme générique recouvrant plusieurs méthodes de purification de l'eau qui généralement : des gaz dissous ; des sels minéraux ; des composés organiques ; des composés biologiques (bactérie, virus, ect .)

Métabolites secondaires : des composés chimiques synthétisés par les plantes qui assurent des fonctions non essentielles, de sorte que leur absence n'est pas létale pour l'organisme.

nano émulsion : est une solution huile dans l'eau (ou l'eau dans l'huile) dont la taille de gouttelette est comprise entre 50 et 100 nm .

Œdème : Gonflement des tissus provoqué par une infiltration de liquide interne.

Pharmacologique : Science des médicaments, de leur effets et de leur emploi.

Souche : Ensemble d'individus issus de repiquage successif d'une colonie microbienne.

Thermophiles : Se dit des organismes qui vivent à des températures élevées.

Tween 80: (Le polysorbate 80) est un tensioactif et un émulsifiant non ionique souvent utilisé dans les aliments et les cosmétiques

Vitamine C : une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière jouant un rôle important dans le métabolisme de l'être humain et de nombreux autres mammifères.

Chapitre II : Les huiles essentielles et les hydrolats

Partie bibliographique

Introduction

Matériel et méthodes

Résultats et Discussions

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Chapitre I : Etude de la plante

I.1 . Généralités sur le genre Pinus

Les Pinus sont répartis dans le monde entier et essentiellement autour des côtes méditerranéennes (**Ching et al., 2010**).

D'après **Farjon, (1990)**, ce sont des arbres ou plus rarement des arbustes persistants, monoïques, aux rameaux régulièrement verticillés, ont des feuilles en forme d'aiguilles qui sont persistantes . Les pinacées sont des conifères c'est-à-dire des plantes portant des cônes. Le bois est recherché tant pour les usages industriels et aussi médicaux (**Ching et al., 2010 ;Mathilde,2002**).

Selon **Quèzel (1963)**, en Algérie on trouve trois genres qui sont :

- Genre abies (le sapin).
- Genre cedrus (le cèdre).
- Genre pinus (les pins).

I.2. Description botanique

Le pin d'Alep est un arbre de 5 à 20 m de hauteur(figure 1) et d'une longévité qui peut atteindre 300 ans. Son tronc est tortueux (**Bernard, 2013**).

D'après **Nahal (1962) ;Debazacet Tomssone (1965) ;Farjon et Brill (2005)** , Son écorce, de couleur gris argent, se fissure avec l'âge. Ses aiguilles mesurent de 6 à 10 cm de longueur et sont groupées par deux en pinceaux à l'extrémité des rameaux. Ses Fleurs mâles et femelles sont séparées, mais sont situées sur le même sujet, toujours groupées en épis. Ses fruits sont des cônes pendants de 8 à 12 cm de longueur, persistant pendant Plusieurs années sur les rameaux. Ses graines abondantes, d'environ 5 mm de longueur, possèdent une grande aile persistante qui permet une dissémination rapide et éloignée.



Figure 1 : *Pinus halepensis* L (aiguille, cône) .

I .3. Noms vernaculaires

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) on l'appelle parfois pin de Jérusalem ou pin blanc.

Le pin d'Alep est connu localement sous le nom vernaculaire de snouber, il a d'autres noms azoumbei en kabylie, et Taida (**Quèzel et Santa 1963**).(figure 2)



Figure 2 : L'espace vital de *Pinus halepensis* au stade bioclimatique semi-aride de la forêt de Balloul (Saïda), (avril 2011, photo KEFIFA) cité par **Kefifa et, Benabdeli 2014**

I.4. Classification de l'espèce

La classification de genre *Pinus* est illustrée dans le (Tableau 01).

Tableau 1 : Classification de l' espèce (Gaussen et al., 1982)

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous –Embranchement	Gymnospermes
Classe	Coniférophytes
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Genre	<i>Pinus</i>
Espèce	<i>Pinus halepensis</i>

I. 5.Répartition géographique

Pinus halepensis est localisé Pratiquement sur tout le bassin méditerranéen, on le retrouve surtout en Europe de sud et en nord-ouest d'Afrique. (Arbez.,1987). Cette espèce est surtout cantonnée dans les pays du Maghreb et en Espagne où elle trouve son optimum de croissance et développement (Parde, 1961 ; in Quezel et al, 1992)(figure 3). En Algérie elle s'étend sur une superficie de 800 000 (Mezali, 2003) , en Maroc 65 000(Bakhiyi ,2000; in Bentouati, 2006), en Tunisie 170 000 à 370 000(Chakroun,1986), en France 202

Partie bibliographique

000(Couhert et Duplat ,1993) ,en Espagne 1 046 978(Montero, 2000; in Bentouati , 2006) et en Italie 20 000 (Seigue ,1985) .

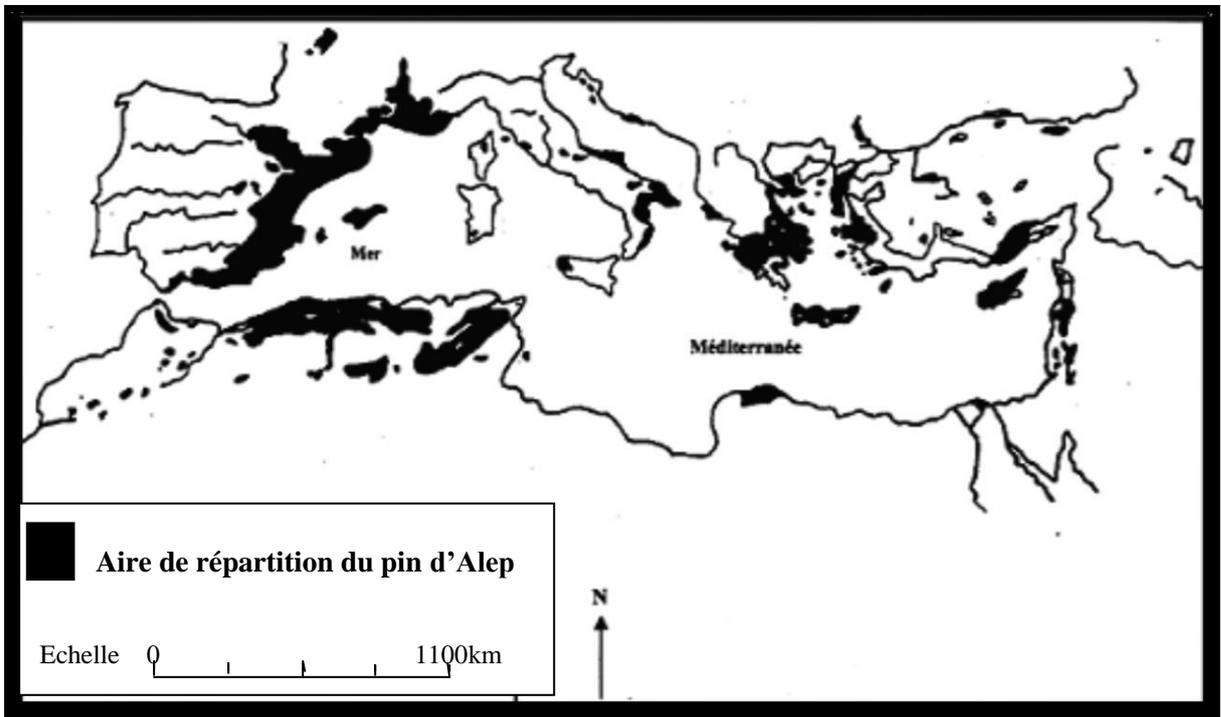


Figure 3 : Aire de répartition de pin d'Alep dans la région méditerranéenne (Quzel, 1986 ; in Bouceddi, 2016).

En Algérie après **Zenzen (2016)**, le pin d'Alep est fréquent surtout sur les massifs du tell littoral et l'Atlas saharien, Il s'étend à lui seul sur près de 850.000 ha, il occupe 37% de la surface effectivement boisée de l'Algérie. Selon **Boudy (1955)**, Le pin d'Alep présente de vastes peuplements en oranais (Sidi-Bel-Abbès, Saïda, Tlemcen, Tiaret) dans l'Algérois (média, Boghar, Monts des Bibans) sur l'Atlas saharien (mont de Ouled Nail) et dans le sud Constantinois (Aurès, région de Tébessa). (figure 4).

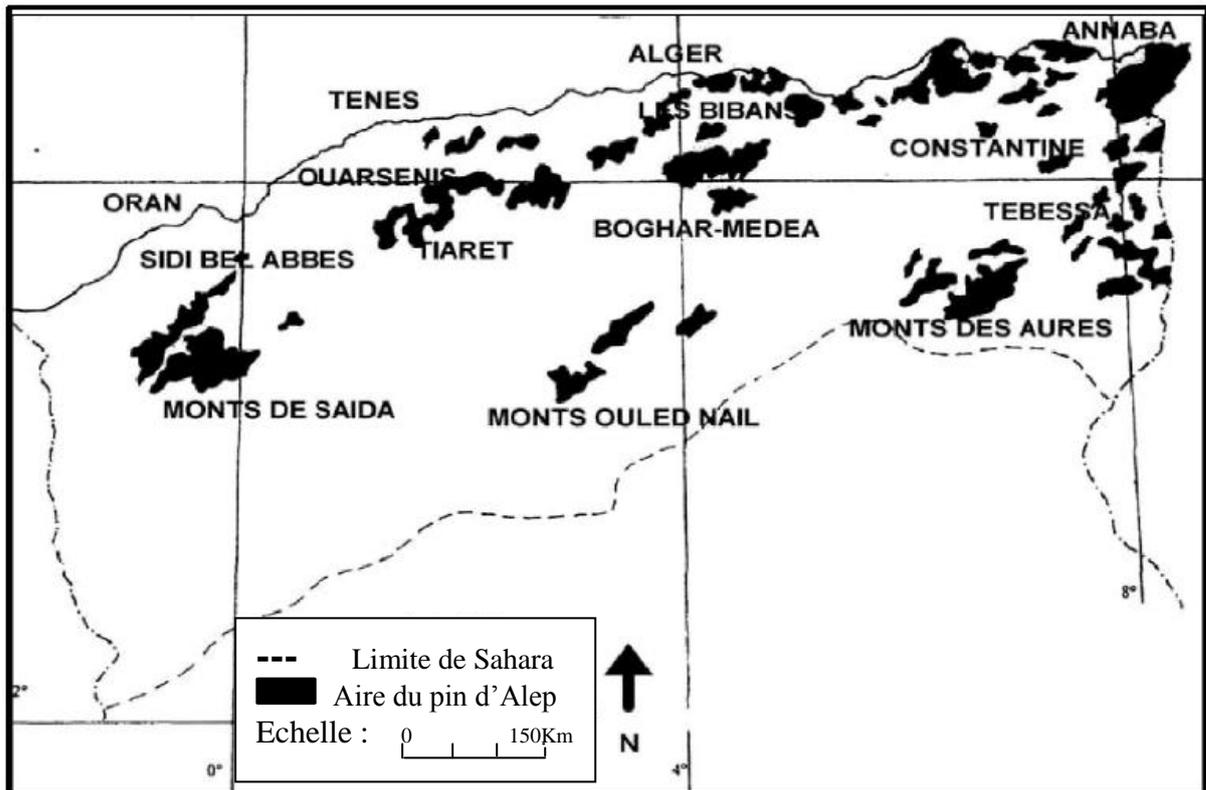


Figure 4: Répartition géographique de *Pinus halepensis*. (Bentouati, 2006 ; in Mezerai, 2014).

I. 6. Origine et habitat

Cet arbre est commun en Afrique du Nord, en Espagne, et en Italie. On le trouve aussi en Palestine, en Jordanie, au Liban, en Syrie, en Turquie, en Grèce et en France dans la région Méditerranéenne. (Ganmi et al., 2005)

Leur habitat est largement distribué dans les zones tempérées de l'hémisphère.

Ces espèces sont très fréquentes dans le bassin méditerrané. Elles sont à la fois thermophiles et héliophiles. Ces conifères préfèrent les soles bien drainés sur lesquels la Croissance est plus rapide.

I.7.Ecologie

D'après (Nahal, 1962), le Pin d'Alep est une essence méditerranéenne qui possède l'amplitude écologique la plus vaste. Il pousse dans des zones où les précipitations annuelles sont comprises entre 200 et 1500 mm. La pluviométrie ne semble pas être un facteur déterminant de la répartition de l'espèce, même si c'est entre 350 et 700 mm de précipitation annuelle qu'elle présente son développement optimal (Quezel et al., 1987).

Un des facteurs climatiques majeurs limitant l'expansion du pin d'Alep est la température. On le rencontre dans des gammes de températures moyennes annuelles allant de 11 à 19°C, ce qui correspond à peu près à des moyennes des minima du mois le plus froid comprises entre -2 et +6 °C. Le pin d'Alep peut supporter des froids accidentels de -15 à -18 °C, à condition qu'ils restent exceptionnels et de courte durée (Nahal, 1962).

D'après Bruno et al.,(2003), les forêts de pin d'Alep peuvent se développer sur tous les substrats et presque tous les bioclimats de la région méditerranéenne (espèce plastique).

I. 8 .Usage et propriétés thérapeutique

Les pins sont largement utilisés en médecine traditionnelle algérienne comme antiseptique. Puissant, il est recommandé pour les infections des voies respiratoires, urinaires, les calculs biliaires, la sinusite et le rhumatisme (Lucienne, 2010).

Le bois de Pin d'Alep peut être utilisé, après élimination de la résine, pour la fabrication de la pâte à papier (Nahal, 1962 ; in Soltani, 2016).

I. 9. Composition chimique

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, CPG/SM, des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des feuilles fraîches de *Pinus halepensis* récoltées à Sidi feradj (Algérie) a indiqué la présence majoritaires de β -Caryophyllène (40,31%), α -humulène (7,92%) et l'aromadendrene (7,1%) (Dob et al., 2005).

Le pin est riche en vitamines ayant un pouvoir nutritif, telles que les vitamines E et F, connues pour leur haut niveau physiologique et propriétés antiacides, les vitamines B1, B2, B3, la provitamine A (bêta- carotène) et d'autres caroténoïdes. Elle contient également jusqu'à 5% de substances azotées, dont 90 % sont les acides parmi lesquels 70% sont des acides aminés essentiels (Moro-Buronzo, 2008).

Partie bibliographie

Des micro –éléments sont également présents, comme le magnésium ; zinc ; fer ; cuivre ; iode ; calcium ; phosphore ; manganèse ; cobalt ainsi qu'une grande quantité d'acides gras polyinsaturés (**Belaiche , 1979**).

Partie bibliographie

II.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques qui se trouvent naturellement dans diverses parties, à savoir les fleurs, les fruits et les feuilles, elles constituent la plus grande force vitales de la plantes naturelle (**Huard, 1999**).

II.1.1. Définition

Selon AFNOR (Association Française de Normalisation) : « ce sont des produits obtenus à partir de matières premières d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation et qui sont ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (**Bruneton et al., 1999**).

Pour certains auteurs, il est important de distinguer huile essentielle et essence (**Carette et al.,2000**) .

Essence : sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée.

Huile essentielle : est un extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenu par distillation par la vapeur d'eau, c'est-à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée.

II.1.2. Répartition et localisation

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans toutes les parties de la plante (fleurs, feuilles, fruits, graines, écorces, tiges, etc) avec une quantité plus importante au niveau des parties supérieures (fleurs et feuilles) (**Aboughe Angone et al., 2015**).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule (**Teucher et al., 2003**).

L'accumulation de ces métabolites secondaires, se fait généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante telle que les poils sécrétrices, les poches sécrétrices et les canaux sécrétrices pour les Astéracées ((**Teucher et al., 2003**).

Partie bibliographie

II.1.3. les techniques d'extraction

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est des plus difficile et des plus délicates puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus utiles et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité (**Lardry et Haberkorn, 2006**).

II.1.3.1. Hydro distillation :

Consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielles se sépare par différence de densité (**Breneton., 1999**).

II.1.3.2. Entraînement à la vapeur d'eau :

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

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique: l'huile essentielle (**Lucchesi., 2006**).

II.1.4 .Classification

Selon la fonction du constituant prédominant, Le **Lourant, (1994)**, classe les HE en trois catégories : HE hydrocarbonées riches en terpènes (Pin, Citron : 90 % en limonène), HE Oxygénés riches en alcools et esters, (roses : 50% en géraniol, Thym : ≥ 30 % en Thymol, Coriandre : 70 à 80 % en linalol) et HE sulfurées (Conifères).

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, et grâce à l'indice aromatique obtenu par des chromatogrammes, **Chakou et Bassou (2007)** classent les huiles essentielles comme suit:

- ✓ Les huiles majeures
- ✓ Les huiles médiums
- ✓ Les huiles terrains

II.1.5. Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse et al., 2008**).

Elles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et soluble dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaibles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (**Couic-Marinier et al., 2013**).

Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé (**Desmares et al., 2008**).

II.1.6. Composition chimique et biosynthèse

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et éminemment variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les composés terpéniques tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes ; et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents comme l'alcool cinnamique. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils comme les acides, alcools, aldéhydes, esters, etc) (**Bakkali et al., 2008 ; Couic-Marinier et al., 2013**).

La biosynthèse des constituants de ces huiles essentielles emprunte deux voies utilisant comme intermédiaires soit l'acide mévalonique, soit l'acide shikimique respectivement pour les terpenoïdes et les phénylpropanoïdes (**Singh et al., 1990**).

II.1.7. Facteurs affectant la variabilité de la composition des huiles essentielles

Les activités biologiques à large spectre des huiles essentielles pourraient être attribuées à la complexité et à la variabilité de leur composition chimique qui sont influencées par de nombreux facteurs (**Mahendra et al., 2017**).

Divers travaux ont démontré que le contenu de l'huile essentielle peut changer en fonction des différences de culture, d'origine, de stade végétatif mais également de facteurs environnementaux comme la température, la pression atmosphérique, la vitesse du vent, l'augmentation des précipitations et l'altitude (**Djerrad et al., 2015**).

Ces facteurs influent sur la croissance de la plante (**Korner, 2007**), la physiologie et la morphologie des plantes, l'écologie et les tendances des organes qui dans le sens

Partie bibliographie

chimique, conduisent à la différenciation entre les espèces **(Reisch et al., 2005)**.

En outre, d'autres études ont révélé une grande variabilité dans la composition chimique des huiles essentielles, qui était principalement corrélée à la variation géographique, conditions environnementales et agronomiques **(Moghtader et al., 2009)**, temps de récolte et méthodes d'extractions **(Djouahri et al., 2013)**.

II.1.8.les techniques d'analyse :

II.1.8.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-MS

Le développement important de la spectrométrie de masse dans l'identification des constituants complexes à été rendu possible grâce au couplage de la chromatographie phase gazeuse directement avec la spectrométrie de masse .Grâce à ce couplage , il n'était plus nécessaire de recourir à l'isolement des constituants purs par chromatographie préparative , et simultanément il devenait possible d'obtenir un spectre de masse .interprétable pour des quantités de substance qui allaient de microgramme au nanogramme **(Richard et Multon .,1992)**.

L'échantillon à analyser est introduit dans le chromatographe puis séparé et analysé.

Les différents constituants gazeux arrivent dans la chambre d'ionisation de spectre de masse ou ils sont fragmentés .Les ions issus de la fragmentation sont dirigés vers le dispositif de séparation, ils sont alors triés suivant leur rapport masse /charge, puis répartition est donnée sous la forme d'un spectre de masse **(Lahlou ., 2004)**

L'appareillage de spectrométrie de masse comprend donc trois parties principales :

- ✓ Une chambre d'ionisation
- ✓ Un système analyseur pour la séparation des ions
- ✓ Un ensemble de détection, amplification et enregistrement.

Un appareillage de CGMS permet donc de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectre de masse correspondant à l'identification précise de chaque constituant séparé par la CPG. **(Lahlou,2004)**.

II.1.9. Les nano/microsystèmes pour l'encapsulation des substances naturelles

II.1.9.1. La nano/micro-technologie un défi pour la science

La nanotechnologie regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de nanoparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. Les matières actives sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes ou encore des cellules (Craveiro., et al 1989). Les matériaux enrobant sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides. Les nanoparticules obtenues présentent deux types de morphologies, soit une nano/microcapsule, c'est-à-dire une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide (plus ou moins visqueux) ou solide, entouré d'une membrane solide continue de matériau enrobant (figure 5); soit une nano/microsphère, une particule constituée d'un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions (figure 5) (Craveiro., et al 1989).

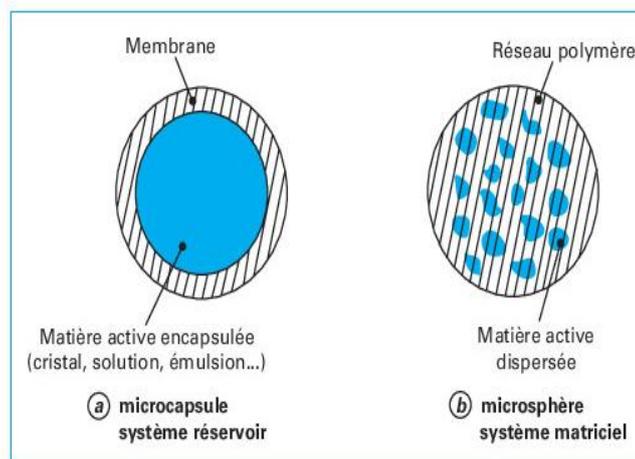


Figure 5 : Morphologie des nanoparticules(Craveiro., et al 1989).

Sur le plan industriel, la nano-encapsulation est mise en œuvre pour remplir les objectifs suivants : assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation, réaliser une mise en forme adaptée, améliorer la présentation d'un produit, masquer un goût ou une odeur, modifier et maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir, par exemple un effet prolongé ou déclenché.

II.1.9.2 Intérêt de la réduction de taille dans le domaine biologique

La taille des particules est extrêmement importante lors de la délivrance et/ou la vectorisation des molécules biologiquement actives. Une taille plus petite permet une plus grande interaction avec les organes et les tissus vivants, une plus grande pénétration cellulaire et donc un effet thérapeutique plus important (**Shahidi, et al 2018**).

II.1.10. Conservation

Les huiles essentielles des conifères se conservent plusieurs années avant de dégager une petite odeur de pneu très lointaine (**Gerault et Mary ,2009**).

Il est préférable de les stocker à l'abri de la lumière et de l'humidité à une température moyenne dans des récipients en métal et en verre anti-UV, éviter les matières plastiques. (**Wichlt et Anton ,2003**).

II.1.11. Toxicité des huiles essentielles

Selon **Englebin (2011)**, les huiles essentielles sont des substances très puissantes et très actives, c'est la puissance concentrée du plant aromatique, il ne faut donc jamais exagérer les doses, quelque soit la voie d'absorption, car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée.

II.2. Les hydrolats

Les eaux distillées florales sont obtenues par entraînement à la vapeur d'eau de plantes aromatique ou non (**Charpentier .et al ., 2004**).

Lors du processus d'obtention des huiles essentielles par entraînement à la vapeur, un sous-produit se forme à partir de l'eau ayant servi à l'extraction des molécules odorantes. Ce produit est l'hydrolat ou hydrosol en anglais. Au cours de la distillation, la vapeur d'eau traverse la matière végétale puis se condense au contact des parois froides d'un réfrigérant. L'eau se dissocie alors spontanément de l'huile essentielle du fait de leur non miscibilité tout en conservant une petite portion des composés volatils de l'huile essentielle (**Price et al, 2004**).

Partie bibliographie

II.2.1. Description

Les hydrolats sont des produits issus de la distillation (hydro- distillation ou entraînement à la vapeur) de fleurs ou de plantes aromatiques. Ils sont également appelés « eaux florales » lorsqu'il s'agit de distillation de fleurs. Les termes « hydrolat » et « eau florale » désigneront les mêmes produits. Ils sont majoritairement utilisés en agroalimentaire notamment pour la conception de pâtisseries autour du bassin méditerranéen, en cosmétique, en pharmacie et en aromathérapie.

Selon l'AFNOR ISO 9235 :2014 (AFNOR 2014), l'hydrolat est un «distillat aqueux qui subsiste après l'entraînement à la vapeur d'eau et la séparation de l'huile essentielle lorsque c'est possible ». Les hydrolats sont les coproduits de distillation des huiles essentielles.

II.2.2. Composition chimique

Les hydrolats contiennent en petite quantité des composés volatils semblables à ceux Présents dans l'huile essentielle ainsi que des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans L'huile.

La composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles: les molécules oxygénées Hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités alors que les composés lipophiles comme les Hydrocarbures terpéniques sont la plupart du temps quasi absents. (Price et al., 2005).

II.2.3.Utilisation

Certains hydrolats sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, Thérapeutiques et culinaires.(Bremness, 1996).

Cependant, avec le regain d'intérêt actuel pour les médecines alternatives telle que L'aromathérapie, les hydrolats sont aujourd'hui de plus en plus utilisés pour leurs vertus Thérapeutiques (Catty, 2001).

II.2.4.Conservation

La conservation des hydrolats dépend de leur contenu en huiles essentielles lesquelles permettent d'augmenter leur stabilité. (Adelon, 1835).

Références bibliographiques

- Aazza S, Lyoussi B, M.G(2012)** :Miguel.Antioxidantactivity of eight hydrosols fromMorocco. Asian J. Plants Sci. 11(3), 137–142p .
- AbougheAngone, S., AworetSamseny, R., et EyeleMveMba, C. (2015)** : Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. Phytothérapie, 13: 283–287p.
- Adelon, N. P. (1835)** : Dictionnaire de Médecine. Tome XI. Édition nonprécisée. 519pp.
- AFNOR ,(2000)**: huiles essentielles Tome 1 échantillonnage et méthodes d'analyses Ed AFNOR ,Paris .590p.
- AFNOR (2000)** : association francaise des normes , recueil de norme.les huiles essetielles ,echantillonnage et méthodes d'analyse (tome I) p : 471 . monographies relatives aux huiles essentielles (Tome II) ,volume 1p :323et 2 p :663).Ed .AFNOR, France.
- Al-TurkiAI (2007)**:Antibacterialeffect of thyme, peppermint, sage, black pepper and garlic hydrosols against Bacillus subtilis and Salmonella enteritidis.International journal of food, agriculture and environment, , 5(2), 92-94p.
- Arbez M.,(1987)**: Les ressources génétiques forestière en France :les conifères,INRA,49 54p.
- Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., and Idaomar, M. (2008)** :Biologiceffects of essential oils. Rev. Food Chem. Toxicol, 46: 446–475p.
- Belaiche P.,(1979)** : Traité de la phytothérapie et d'aromathérapie,Tome 1,l'aromatogramme ,. 135-147p,ISBN2-224-00520-2.
- Benaziza A .,(2017)** : Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antioxydante des extraits de feuilles et de cônes de Pinus halpensis (Pin d'Alep).50-58p
- Bentouati A., (2006)** : Croissance, productivité et aménagement des forêts de Pin d'Alep (pinushalepensis Mill) du massif de OuledYagoub (Khenchela- Aurés). Thèse de doctorat. Univ de Batna.9-116
- PBERGEY'S, (2001)** :bacteriologieEd ,Dunod , Paris.415p
- Berroukche, A., Amara, S., Halimi, S., &Benyamina, F. (2014)** : Evaluation of the Leave and BudDecoctionsPinushalepensis Mill Effects on the Induced

PhenolRenalToxicity in Wistar Rats. Journal of Fundamental and Applied Sciences, 6(2), 197-207p.

Boudy P, (1955) : Economie forestière nord-africaine. Tome 4 : Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie. Larose, Paris, 483 p.

Boukhalfa R.,(2008): Evaluation des huiles essentielles des trois espèces des plantes du genre Pinus. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en agronomie Université Saad Dahleb:46p.

Bremness, L. (1996): L'oeil nature: Les plantes aromatiques et médicinales. Bordas Nature Paris. 303 P.

Bruneton J.,(1993) : Pharmacognosie ,phytochimie plantes médicinales ,2ème édition :Levoisier , Tec et Doc ,Paris :915p.

Bruneton J.,(1999) : Pharmacognosie ,Phytochimie ,Plantes médicinales , 3ème édition, Ed.Tec&doc,.625-910p , ISBN : 2-7430-0315-4.

Bruneton J., (1999) : Pharmacologie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Edition, Tec & Doc,;.406,410,416-417p.

Bruneton, J. (1999) :Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Ed: TEC et DOC. Lavoisier

Bruneton J., (1999): Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales ,2ème édition : Lavoisier, Tec &Doc, Paris, 915p.

Catty, S. (2001):Hydrosois, the nextaromatherapy. Healing Arts Press. Rochester. 290 p.

Carette, A.S. (2000) : La lavande et son huile essentielle. In Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289p.

Chakroun L, (1986):Le pin d'Alep en Tunisie. Options Méditerranéennes. Série Etude CIHEAM 86/1, 25-27p.

Charpentier B .et al ., (2004) :Guide du préparateur en pharmacie , 2èmeédition Masson , paris , 1300p.

Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., &Attia, H. (2006) :Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinushalepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 12(5), 407-415p.

Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C., &Attia, H. (2008) :Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinushalepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), 162-168p.

Ching P.L., Jen P.H., Chung-S W., Chih Y.H., Chaw S.M (2010) : Comparative Chloroplast Genomics reveals the evolution of Pinaceae Genera and Subfamilies. *Genome Biology*, 504–517p.

COLLOT .M(1972) : Notion techniques de pharmacologie générale .Edition Masson .

Couhert B et Duplat P, (1993) :Le Pin d'Alep. Rencontres forestiers-chercheurs en forêt méditerranéenne. La Grande-Motte (34), 6-7 octobre 1993. Ed. INRA, Paris 1993. (Les colloques n°63), 125-147p.

Couic-Marinier, F., and Lobstein, A. (2013) : Composition chimique des huiles essentielles. *Actual. Pharm*, 52: 22–25p.

Craveiro, A. A., et al (1989):"Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 ;43-44p.

Dahel.R ,(2015) : Le parc national de chréa une aire protégée à influence régionale ,*Revue Agrobiologia* 2015 ;N0 7 ,5_7p.

Debazac E F., Tomassone R ., (1965) : Contribution à une étude comparée des pins.

De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. (1998): "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analyticachimica acta* 369.1-2 ,1-10p.

Degryse, A.C., Delpla, I., et Voinier M.A. (2008) : Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.

Desmares, C., Laurent, A., et Delerme C. (2008) : Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p.

Djerrad, Z., Kadik, L., and Djouahri, A. (2015) :Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Ind. Crops Prod*, 74: 440–449p..

Djouahri, A., Boudarene, L., and Meklati, B.Y. (2013) :Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian. *Ind. Crops Prod*, 44: 32–36p.

Dib M.E., Djabou N., Allali H., Paolini J., Tabti B., Costa J. & Muselli A. (2015):Chemical Composition of Essential Oils and Hydrosol Extracts of *Daucus muricatus* and Assessment of Its Antioxidant Activity, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 21:1, 23-37p.

Dif, M., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., et Becheikhi, F.A. (2015) : Enquête sur l'utilisation phytothérapique de 11 plantes médicinales poussant dans le Tessala. *Phytothérapie*, 13: 295–297p.

Disalvo, E. A., & Bouchet, A. M. (2014). Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 440, 170-174.

Dob T., Berramdane T. & Chelghoum C. (2005) : Analysis of Essential Oil from the Needles of *Pinus pinaster* growing in Algeria; Ed. Kimiya Prirodnikh Soedinenii, N°. 5, pp. 445–447p.

Dob T., Berramdane T. & Chelghoum C. (2002). Chemical composition of Essential Oil from the Needles of *Pinus halepensis* Mill. Growing in Algeria. Ed. Elsevier N°8. Paris, pp. 1939-1945

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914.

D. Valero. (2008) : The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology*. (19): 464-471p.

Ee, S. L., Duan, X., Liew, J., & Nguyen, Q. D. (2008) : Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method. *Chemical Engineering Journal*, 140(1-3), 626-631p.

EL Amrani A. ;Zrira S . ; Achal El Kadmiri A. ; Belanger A. ;IsmailiAlouani M. ;Berrada M. ;(1997) : Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles.EditionAcCTES .548p.

Farjon A.,Pinaceaekonigstein(Germany) (1990) :KoeltzScientificBook.

Farjon A. L.,Brill (2005): Pins Schemas et descriptions du genre pinus.

Fekih N., Allali H., Merghache S., Chaib F., Merghache D., Dib M.A., Djabou N.,Muselli A., Tabti B., Costa J. (2014) :Chemical composition and antibacterialactivity of Pinushalpensis Miller growing in West Northern of Algeria , Asian Pacific Journal of TopicalDisease (APJTD), 4(2) :97-103p.

GarneroJ.,(1991) : Les huiles essentielles, leur option, leur composition ,leur analyse et normalization ,Edition technique .Encyclo .Med.Nat.,Paris 9,20p.

Gausse H., Leroy J.F., Ozenda P. (1982) : Précis de botanique ,Végétauxsuperieurs. Ed. Masson. Paris. P55. ISBN: 2-225-65483-2.

Ghanmi S.,bouazizi M.L. et Bouhaddi N .,(2005) : optimisation multi objectifs en 7^{ème} colloque national en calcul des structures ,Giens , France

Ghougali F.,(2011) : Contribution à l'évaluation de la diversité et du contrôle génétique de la croissance et de la fructification chez les pins de types halepensis (Pinus brutia-Pinus halepensis) .8-9p .

GuilleameGerault , Ronald Mary , (2009) : le guide de l'aromathérapie Ed, Albin Michel .381p.

Halimi A. , (1980)- L'Atlas Blidéen : climat et étages végétaux O.P.U.,Alger,523p.

Hebi, M., and Eddouks, M. (2016) : Evaluation de l'activité antioxydante de Steviarebaudiana. Phytothérapie, 14:17–22p.

Hussein J., T(2011) :Chalachew, M. Jemal, Assessment of the antimicrobialeffects of someEthiopianaromaticspice and herb hydrosols. Int. J. Pharmacol. 6(5), 635–640p.

Jacues brosse, (2003) : Larousse des arbres dictionnaire des arbres et des arbustes, Edition Rustica/ FLER, Paris pp 325. N°de l'editeur ; 48396N1 (F12062).

J. Paolini, C. Leandri, J.M. Desjobert, T. Barboni, J. Costa (2008) : Comparison of liquid-liquid extractionwithheadspacemethods for the characterization of volatile fractions

of commercial hydrolats from typically Mediterranean species.. J Chromatogr A.1193. (1-2): 37-49p.

Kefifa A, Benabdeli K . 2014 . Contribution to the Study of the Structure of the Main Ligneous Species in the Preservation of Forest Spaces in the Monts of Saida and Dhaya (Algerian West). ECOLOGIA BALKANICA. International Scientific Research Journal of Ecology . Volume 6, Issue 1 pp. 11-18

Korner, C. (2007) : The use of 'altitude' in ecological research. Trends Ecol. Evol, 22:11p.

Lahlou, (2004): methods to study photochemistry and bioactivity of essential oil. Phytotherapy research .448p.

Lardry J.M., Haberkon V., (2006) : produits à usages externes et masso-kinésithérapie. kinésithérapie, les annales n°16, AVRIL PS :9-26 vol :240.

Lucchesi M.E., Thèse de Doctorat (2006) : Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des Huiles Essentielles, Université de la Réunion-France,;11,16-18,22,23,59p.

Lucienne A. (2010) : Les plantes médicinales d'Algérie. 2ème Ed. Berti, Alger, p 200201.

M.A. Serrano, D. Martí'nez-Romero, F. Guille'n, J.M. Valverde, P.J. Zapata, S. Castillo, Mathilde M., (2002) : Larousse Agricole (le monde agricole au XXIesiècle), 480-481p.

Macchioni F., Cioni P.L. , Flamani G., Morelli L., Perrucci S., Franceschi A., Macchioni G., Ceccarini L., (2002) : Acaridial activity of pine essential oils and their main components against Tyrophagus putrescentia, a stored food mite. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(16):4586-8..

Maestre F., Cortina J., Bautista S., Bellot J. (2003). Does Pinus halepensis facilitate the establishment of shrubs in Mediterranean semi-arid afforestations? Forest Ecology and Management, 176: 147-160

Manayi, A., Saeidnia, S., Shekarchi, M., Hadjiakhoondi, A., Shams Ardekani, M. R., & Khanavi, M. (2014) : Comparative study of the essential oil and hydrolate composition of Lythrum salicaria L. obtained by hydro-distillation and microwave distillation methods. Research Journal of Pharmacognosy, 1(2), 33-38p.

Maurice N.,(1937) : Aromathérapie-Les huiles essentielles hormones végétales, mécanique des structures :Approche basée sur les surface de réponse

adaptive,méditerranée.Edition scientifiques et médicales Elsevier SAS.Paris ,pp.28

125,Méditerranées de la Section Halepensis.Extr.Annales Sciences

Mechergui, K., Jaouadi, W., Coelho, J.P., and Khouja, M.L. (2016) : Effect of harvestyear on production, chemical composition and antioxidantactivities of essential oil of oregano (*Origanumvulgaresubspglandulosum* (Desf.) Ietswaart) growing in NorthAfrica. *Ind.CropsProd*, 90: 32–37p.

Mezali M, (2003) :Rapport sur le secteur forestier en Algérie. 3ème session du forum des NationsUnis sur les forêts, 9 p.

Mezerai DJ, (2014) :Ecologie du pin d'Alep (*Pinushalepensis*) dans la région du Tlemcen, mémoire, master en biologie, univ. Tlemcen, 85 p.

Moro-Buronzo A ., (2008) : Grand guide des huiles essentielles : Santé,Beauté,Bien-Etre,HACHETTE pratique :14p.

Moghtader, M., and Afzali, D. (2009) :Study of the antimicrobialproperties of the oil of Rosemary. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci*, 5 (3): 393–397p.

Molyneux, P. (2004) : The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (dpph) for estimatingantioxidantactivity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211–219p.

Muanda, N F., Koné, D., Dicko, A., et al. (2009) :Phytochemical composition and antioxidantcapacity of threemalianmedicinal plant parts. *Evidence-BasedComplementary and Alternative Medicine*, 3:147–60p.

Nahall.,(1962) :Le pin d'Alep .Etude taxonomique ,phytogéographique ,écologique et sylvicole. *Annales de l'école Nationale des Eaux et Forets* 19(4) :533-627.93p.

Nahal I. (1962) : Le pin d'Alep. Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. *Annales de l'école Nationale des Eaux et Forêts* 19 (4) : 533-627p.

Nait Bachir, Y .,Zafour,A ., Medjkane M et al.,(2017) : Formulation of stable microcapsules suspensions content *Salvia officinalis* extract for Its antioxidant activity preservation.

Nait Bachir, Y, Nait Bachir, R & Hadj-Ziane-Zafour, A (2018): Nanodispersions stabilized by β -cyclodextrin nanosponges: application for simultaneous enhancement of bioactivity and stability of sage essential oil, Drug Development and Industrial Pharmacy, DOI: 10.1080/03639045.2018.1542705.

Okoli C.O., Akah P.A., Nwafor S.V., Anisiobi A.I., Ibegbunam I.N., Erojikwe O, (2007) : Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana*. J. Ethnopharmacology: 219p.

Parde J, (1961): Dendrométrie. E.N.E .F., Nancy. 328p.

Price, L; Price, S. (2004) : Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy. Churchill Livingstone. 294 p.

Quèzel P., Santa S., (1963) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition du centre national de la recherche scientifique, Paris,, 616-620p.

Quèzel P., Santa S. (1963) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre national de la recherche scientifique, Paris, 38-39p.

Quezel P., (1976) : les forêts du pourtour méditerranéen .In : forêts et maquis méditerranéen : écologie, conservation et aménagement. Paris, note techn.. MAB, 2:9-33p.

Quezel P., (1986) : Biogéographie et écologie des conifères sur le pourtour méditerranéen. Dans : Actualités d'Ecologie Forestière (Ed. : Pesson), Ed. Gauthier Villars, Paris, 205-256p.

Quezel P., (1986) : Les pins du groupe —Halepensis|| Ecologie, Végétation, Ecolphysiologie. CIHEAM- Options Méditerranéennes. 11-23. 42p.

Quezel P et Barbéro M, (1992) : Le pin d'Alep et les espèces voisines ,répartition et caractères écologiques généraux, sa dynamique récente en France méditerranéenne. Forêt Méditerranéenne III (3) : 158-170p.

Reisch, C., Anke, A., and Rohl, M. (2005) : Molecular variation within and between provenances of *Primula farinosa* (Primulaceae) along an altitudinal gradient in the northern Alps. Basic Appl. Ecol, 6: 35–45p.

Richard et Multon ,(1992): les aromes alimentaires Ed ,Lavoisier ,paris. 538p (science et technique agroalimentaire)

Russo-Marie F., Peltier A, Polla,(1998) : L'inflammation, Ed :John Libbey Eurotext,Paris,:198p.

Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadeif, Y. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. 58 du Nord est Algérien. Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie, 30(1), 3339.

Safaei-Ghomi J., GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanolextracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. Food Chemistry, 115 :1524

Sbay, H & Hjib S., (2012) : Le pin pignon ;une espèce de choix dans le contexte des changements climatiques. Editeur : centre de recherche forestière

Seigue A, (1985) : La forêt circum méditerranéenne et ses problèmes. Ed. Maison neuve et Larose. Paris. 502 p.

Seladji D.,(2014) :Compositions chimiques, propriétés microbiennes et antioxydants des huiles essentielles des racines de trois pinaceae d'Algérie

Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara (2018): "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* 1323-1356p

Singh, J. (2008): "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 , 32-35p.

Soltani A, (2016) : Typologie et Fertilité des stations de pin d'Alep de la forêt de Benjloud (Saida), mémoire, master en foresterie, univ. Tlemcen, 141 p.

Teucher, E., Anton, R., and Lobstein, A. (2003) : Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Lavoisier.

Thielbeer, F., Donaldson, K., & Bradley, M. (2011): Zeta potential mediated reaction monitoring on nano and microparticles. *Bioconjugate chemistry*, 22(2), 144-150p.

Vardar-Ünlü G., (2003) :Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanolextracts of *Thymus pectinatus* Fisch, *Food Chemistry*, , 51 :.63p.

Zenzen W, (2016) : Utilisation du S.I.G pour l'analyse de la structure de la forêt de Ouennougha dans la Wilaya de Bordj Bou Arréridj, mémoire, master en foresterie ,univ. Tlemcen 60p.

Zimoch-Korzycka A., Bobak L. &Jarmoluk A. (2016):Antimicrobial and AntioxidantActivity of Chitosan/HydroxypropylMethylcellulose Film-Forming Hydrosols Hydrolyzed by Cellulase. Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 1436.