

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université de Blida-1-**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie des Population des Organismes**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de**

**Master en biologie**

**Option : Phytothérapie et Santé**

**Thème**

Caractérisation des huiles essentielles de *Pinus halepensis* (pin d'Alep) et étude de leurs propriétés Antimicrobienne et Antioxydante

Par :

BECISSA OUSSAMA

Date de soutenance :

-- /06/2016

**Devant le jury composé de :**

<b>M<sup>me</sup> ZERKAOUI E. A.</b>	<b>MAA / BPO</b>	<b>UBD -1-</b>	<b>Présidente de jury</b>
<b>M<sup>me</sup> AMEDJKOUH H.</b>	<b>MAA / BPO</b>	<b>UBD -1-</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>r</sup> HAMAIIDI M. S.</b>	<b>Professeur</b>	<b>UBD -1-</b>	<b>Promoteur</b>
<b>M<sup>me</sup> BENOAKLIL F.</b>	<b>MAA / BPO</b>	<b>UBD-1-</b>	<b>Co-promotrice</b>

Année universitaire 2014/2015



## Remerciements

*J'adresse mes humbles remerciements à mon promoteur*

*M<sup>r</sup> Hamaidi M. S. qui a accepté d'encadrer ce travail,*

*à ma co-promotrice M<sup>me</sup> BENOUAKLIL F.*

*pour ses conseils et ses orientations*

*je lui exprime ici ma grande considération*

*Mes remerciements s'adressent aussi à :*

*M<sup>me</sup> CHERIF H. S. de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury.*

*M<sup>me</sup> AMEDJKOUH H. et M<sup>me</sup> ZERKAOUI E. A. qui ont bien voulu prendre part à l'examen  
de ce mémoire.*

*J'adresse également mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à  
l'aboutissement de ce projet :*

- . M. Arslane Benseddik, Chef de la Circonscription de EL-Haourane M'sila*
- . Directeur du Jardin d'Essais d'El Hamma (Alger) et à tous le personnel du conservatoire.*
- . M. Kamel Seghiri, M<sup>elle</sup> Sara Chaabane, respectivement Responsable et Ingénieure de  
Laboratoires du Département de Biologie, Université de M'sila.*
- . M<sup>me</sup> Bakhti F, Responsable de Laboratoire des Contrôles Physicochimiques, ainsi qu'à tous  
les laborantins, techniciens et administrateurs du Complexe Antibiotical de SAIDAL  
(Médéa).*

*Je désire remercier amplement mes très chers amis Benyahia Salah et Boudiaf Nazih  
qui ont pu et su me soutenir durant mon travail.*

*Je tien aussi à remercier l'ensemble des professeurs du département de biologie des  
populations des organismes et spécialement mes camarades étudiants à l'Université de Blida*

# Dédicace

*A celle qui m'a mis au monde.*

*A celle qui ma offert un soutien inconditionnel durant  
toute ma vie*

*A ma chère maman*

*Que Dieu nous la garde toujours heureuse.*

*A celui qui ne se fatigue jamais pour nous apporter la  
joie.*

*A mon cher père*

*A la mémoire de mon grand père que dieu repose son  
âme en paix*

*A mes frères et mes sœurs*

*A toute ma famille*

*A mes amis et à tous ceux qui n'ont pas été cité  
amicalement*

*Oussama*

# Résumé

---

Dans le but de sélectionner de nouveaux produits végétaux ayant des activités biologiques, la présente étude porte sur l'évaluation des effets biologiques des huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes du pin d'Alep (*Pinus halepensis*), poussant dans la forêt d'El Haourane à M'sila.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par Hydrodistillation avec un rendement appréciable de  $1,34\% \pm 0,01$  pour les aiguilles,  $0,63\% \pm 0,007$  pour les branches et  $0,35\% \pm 0,03$  pour les cônes. Les indices de qualité Physico-chimique des huiles essentielles étudiées sont comparables aux résultats rapportés dans la littérature.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles contre quatre souches de bactéries pathogènes, une levure et un champignon, en employant la méthode de diffusion à partir de disques solides (Aromatogramme), a révélé une activité antibactérienne comparable à celle des antibiotiques contre une seule souche bactérienne (*Bacillus subtilis*) et une activité antifongique remarquable vis-à-vis de la levure et du champignon connus pour leur résistance aux antifongiques.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de réduction du radical libre DPPH a montré que l'huile essentielle des branches est plus efficace ( $0,105 \times 10^{-3}$ ) que celles des aiguilles et des cônes ( $0,23 \times 10^{-3}$  et  $0,053 \times 10^{-3}$ ). Ainsi, les huiles essentielles du pin d'Alep sont largement moins efficaces que l'acide ascorbique qui a une efficacité de  $4,57 \times 10^{-3}$ .

**Mots clés :** *Pinus halepensis*, Huiles Essentielles, qualité Physico-chimique, activité Antimicrobienne, activité Antioxydante.

## Abstract

---

To select new plant products with biological activities, this study focuses on the evaluation of biological effects of essential oils from the needles, twigs and cones of Aleppo pine (*Pinus halepensis*), growing in the El Haourane forest in M'sila.

The essential oils which was extracted by Hydrodistillation using a Clevenger-apparatus, Give a appreciable yields : 1.34%  $\pm$  0.01 for Needle, 0.63  $\pm$  0.007% for twigs and 0.35%  $\pm$  0.03 for cones. The physico-chemical indexes of essential oils are similar to the results reported in the literature.

The evaluation of the antimicrobial power of essential oils against four strains of pathogenic bacteria, yeast and fungi, using the diffusion method from a solid disk (Aromatogram) revealed a similar antimicrobial activity that antibiotic against a single bacterial strain (*Bacillus subtilis*), even against yeast and fungus resistant to antifungal.

The study of antioxidant activity by reducing free radical DPPH method showed that the essential oil of twigs is more efficient ( $0.105 \times 10^{-3}$ ) than needles and cones ( $0.23 \times 10^{-3}$   $0.053 \times 10^{-3}$ ). Also, essential oils of Aleppo pine are much less effective than ascorbic acid with an efficiency of  $4.57 \times 10^{-3}$ .

**Keywords:** *Pinus halepensis*, Essential oils, Physico-chemical Indexes, Antimicrobial activity, Antioxidant activity.

## ملخص

من أجل اختيار مواد طبيعية جديدة ذات نشاطات بيولوجية، تركّز هذه الدراسة على تقييم التأثيرات البيولوجية للزيوت العطرية المستخلصة من الإبر والأغصان ومخاريط الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis*)، الذي ينمو في غابة الحوران بولاية المسيلة.

تم استخراج الزيوت العطرية عن طريق التقطير بالبخر حيث بلغ متوسط عائد العملية نسبا ملموسة : 1.34%  $\pm$  0.01 بالنسبة للإبر، 0.63%  $\pm$  0.007 للأغصان و 0.35%  $\pm$  0.03 بالنسبة للمخاريط. أما جودة المؤشرات الفيزيائية والكيميائية المدروسة فهي مماثلة و تتطابق مع النتائج المتحصل عليها في أعمال أخرى.

أظهر تقييم نشاط الزيوت الأساسية كمضاد للميكروبات ضد أربعة أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض وخميرة وفطر، وذلك باستخدام طريقة الانتشار من خلال قرص صلب (Aromatogramme) نشاطا مضاد للميكروبات مماثل للمضادات الحيوية المستعملة ضد بكتيريا واحدة (*Bacillus subtilis*)، و حتى ضد الخميرة و الفطر المعروفان بمقاومتها للمضادات الفطرية.

أظهرت دراسة القدرة المضادة للأوكسدة من خلال طريقة ارجاع الجذر الحر DPPH أن زيت الأغصان أكثر فعالية ( $0.105 \times 10^{-3}$ )، من زيت الإبر والمخاريط ( $0.053 \times 10^{-3}$  -  $0.23 \times 10^{-3}$ )، بالرغم من هذا، إلا أن الزيوت الأساسية المستخرجة من الصنوبر الحلبي هي أقل فعالية بكثير من حمض الأسكوربيك  $4.57 \times 10^{-3}$ .

**الكلمات المفتاحية :** الصنوبر الحلبي، *Pinus halepensis*، الزيت العطري. المؤشرات الفيزيائية والكيميائية، مضاد للميكروبات، القدرة المضادة للأوكسدة

# TABLE DES MATIERS

---

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Glossaire**

<b>INTRODUCTION</b>	1
<b>CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	3
1 Pin d'Alep	3
1.1 Systématique	3
1.2 . Description botanique	4
1.3 . Phénologie et croissance de l'espèce	7
1.4 . Distribution phytogéographique	8
2 Huiles essentielles	10
2.1 Définition	10
2.2 Lieux de synthèse des huiles essentielles	10
2.3 Méthodes d'extraction des huiles essentielles	10
2.4 Composition chimique des huiles essentielles	12
2.5 Rôle physiologique des huiles essentielles	13
2.6 Propriétés physicochimiques des huiles essentielles	13
2.7 Propriétés biologiques des huiles essentielles	13
2.8 Toxicité	14
2.9 Huile essentielle du Pin d'Alep	14



3	Activité antioxydante	15
3.1	Définition	15
3.2	Antioxydants naturels	15
4	Activité antimicrobienne des huiles essentielles	16
	<b>CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES</b>	17
1	Matériel	17
1.1	Matériel biologique	17
1.2	Matériel non biologique	18
2	Méthodes	18
2.1	Extraction des huiles essentielles	18
2.2	Étude de la cinétique d'extraction	19
2.3	Détermination de la teneur en eau	19
2.4	Calcul du rendement en huiles essentielles	19
2.5	Étude analytique des huiles essentielles	20
	2.5.1 Propriétés organoleptiques des huiles essentielles	20
	2.5.2 Indices physico-chimiques	20
2.6	Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	25
2.7	Évaluation de l'activité antioxydante	28
	<b>CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION</b>	30
1	Détermination du rendement d'extraction	30
2	Etude de la cinétique d'extraction	31
3	Étude analytique des huiles essentielles	32

4	Activité antimicrobienne des huiles essentielles	35
5	Activité antioxydante	41
	<b>CONCLUSION</b>	45
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
	<b>ANNEXES</b>	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES

---

<b>Figure 1 :</b>	Jeune arbre de <i>Pinus halepensis</i> –EL HAOURANE de M'sila	4
<b>Figure 2 :</b>	Écorce du Pin d'Alep jeune avant formation du rhytidome	4
<b>Figure 3 :</b>	Rhytidome du Pin d'Alep vieux, très crevassé	4
<b>Figure 4 :</b>	Rameaux du pin d'Alep	5
<b>Figure 5 :</b>	Bourgeons végétatifs du pin d'Alep	5
<b>Figure 6 :</b>	Aiguilles du pin d'Alep	5
<b>Figure 7 :</b>	Cônes mâles du pin d'Alep	6
<b>Figure 8 :</b>	Cônes femelles du pin d'Alep	6
<b>Figure 9 :</b>	Cône de pin d'Alep, ouvert (A), fermé (B)	6
<b>Figure 10 :</b>	Graine ailée de Pin d'Alep	6
<b>Figure 11 :</b>	Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne	8
<b>Figure 12 :</b>	Aire de répartition du Pin d'Alep en Algérie	9
<b>Figure 13 :</b>	Montage d'extraction par Hydrodistillation	11
<b>Figure 14 :</b>	Matériel végétal : Aiguilles (A), Branches (B), Cônes (C)	17
<b>Figure 15 :</b>	Teneur en eau des Aiguilles (A), Branches (B) Cônes (C) de <i>Pinus halepensis</i>	30
<b>Figure 16 :</b>	Cinétique d'Hydrodistillation en fonction du temps	31
<b>Figure 17 :</b>	Photos montrant la résistance des souches testées à l'effet antimicrobien des huiles essentielles du pin d'Alep	36
<b>Figure 18 :</b>	Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle des aiguilles (A) des branches (B) et des cônes (C), sur <i>Bacillus subtilis</i>	37
<b>Figure 19 :</b>	Photos montrant la résistance de <i>C.albicans</i> (A), et <i>A.brasiliensis</i> (B) à l'effet antimicrobien de l'huile essentielle des aiguilles	37
<b>Figure 20 :</b>	Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle des branches sur <i>C.albicans</i> (A), et <i>A.brasiliensis</i> (B)	38
<b>Figure 21 :</b>	Photos montrant l'effet antimicrobien des différents antibiotiques sur : <i>S. aureus</i> (a), <i>E. coli</i> (b), et <i>C. albicans</i> (c)	38
<b>Figure 22 :</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes Concentrations utilisées pour les huiles essentielles.	41

<b>Figure 23 :</b>	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des différentes Concentrations utilisées pour l'Acide ascorbique	41
<b>Figure 24 :</b>	Cinétique de réduction de DPPH avec les huiles essentielles et l'Acide ascorbique	42

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau I :</b>	Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huile essentielle	27
<b>Tableau II :</b>	Rendement en huiles essentielles du Pin d'Alep	31
<b>Tableau III :</b>	Propriétés organoleptiques des huiles essentielles obtenues	32
<b>Tableau IV :</b>	Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles du pin d'Alep	33
<b>Tableau V :</b>	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne exprimée en mm (moyenne ± écart type), transcrite en sensibilité	35
<b>Tableau VI :</b>	Comparaison des coefficients de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du pin d'Alep et des antibiotiques utilisés	36
<b>Tableau VII :</b>	Comparaison des résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées avec les résultats trouvées dans la littérature	40
<b>Tableau VIII :</b>	Paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH	44

## Liste des abréviations, symboles et conventions

---

<b>AFNOR</b>	Association française de normalisation
<b>AO</b>	Anti-Oxydant
<b>ATCC</b>	Collection des Cultures Bactériennes de type American
<b>BHT</b>	Hydroxytoluène butylé
<b>BTS</b>	Bouillon Trypticase soja
<b>CAB</b>	Cetrimide Agar Base
<b>DL</b>	Dose létale
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DPPH</b>	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
<b>EA</b>	Efficacité anti-radicalaire
<b>FA</b>	Fusidic Acid
<b>FT</b>	Nitrofurantoin
<b>IA</b>	Indice d'Acide
<b>IC</b>	Concentration Inhibitrice
<b>IE</b>	Indice d'Ester
<b>Ip</b>	Indice de peroxyde
<b>IPM</b>	Imipenem
<b>IR</b>	Indice de réfraction
<b>KF</b>	Karl Fischer
<b>LPS</b>	Lipo-polysacharides
<b>M</b>	Molaire (mol/ litre)
<b>McF</b>	Mac Farland
<b>MtOH</b>	Méthanol
<b>N</b>	Normalité
<b>N.R</b>	Non recherché(e)
<b>NF ISO</b>	Norme Française Organisation Internationale de Normalisation
<b>Nys</b>	Nystatine
<b>OFX</b>	Ofloxacin
<b>ORL</b>	Oto-Rhino-Laryngologie
<b>Pa</b>	Pascal
<b>PFE</b>	Projet de Fin d'Etude

<b>Ph. Eur</b>	Pharmacopée Européenne
<b>Psi</b>	Pound per square inch
<b>SAB</b>	Sabouraud
<b>TEC</b>	Temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC50
<b>TSA</b>	Trypticase soja agar
<b>UFC</b>	Unité formant colonie
<b>USP</b>	Pharmacopée des Etats-Unis
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>V</b>	Volume
<b>VRBG</b>	Gélose au cristal violet, rouge neutre, bile et glucose

# Glossaire

---

Selon : Larousse., 1964 et Wikitionaire., 2016

<b>Synergie</b>	Action combinée de plusieurs éléments associés
<b>Astringente</b>	Qui resserre les tissus vivants
<b>Balsamique</b>	Qui a une propriété, une vertu ou une qualité analogue à celle du baume
<b>Canton</b>	Une partie de forêt
<b>Carminative</b>	Qui favorise l'expulsion des flatuosités contenus dans l'intestin, en parlant des substances médicinales
<b>Circulatoire</b>	Qui a rapport à la circulation sanguine
<b>Cohobage</b>	Recyclage, pendant une distillation, de l'eau recueillie à la sortie de l'appareil après séparation de l'essence
<b>Crevascée</b>	Qui se crève, se fend par excavation ou fission produisant des ouvertures profondes à la surface (crevasse)
<b>Emolliente</b>	Qui a pour effet d'améliorer, d'adoucir les parties enflammées
<b>Energiquement</b>	Activement avec force
<b>Filiforme</b>	Forme très mince comme un fil
<b>Léthargie</b>	Sommeil profond et continu qui donne au malade une apparence d'insensibilité complète
<b>Macrophanérophyte</b>	Plante ligneuse dont les bourgeons, positionnés à plus de 5 m du sol, mais à moins de 25 m
<b>Obovale</b>	De forme ovale, dont la partie supérieure est plus large que la partie inférieure
<b>Polycyclique</b>	Qui effectue plusieurs pousses par an



<b>Rhytidome</b>	Une structure faite de cellules mortes constituant, l'écorce externe des arbres avec des parties de phellogène
<b>Rubéfiant</b>	Substance qui, appliquées sur la peau, y causant de l'inflammation, de la rougeur
<b>Sempervirent</b>	A feuilles persistantes
<b>Sérotineux</b>	Cônes saturés en résine restant sur l'arbre parent, sans ouvrir, pour une année ou plus, après la maturité des graines à l'intérieur
<b>Sillonné</b>	Marqué de stries profondes, de fentes ou raies creuses
<b>Sinueux</b>	Qui fait plusieurs tours et détours
<b>Veinotonique</b>	Egalement appelé phlébotonique, qui limite la dilatation de la veine et le phénomène inflammatoire

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie est d'un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Ainsi, elle est devenue aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient du fait que les plantes médicinales représentent une source immense et inépuisable de molécules naturelles bioactifs exploitées par l'Homme dans l'industrie pharmaceutique [Chamount et Leger., 1989].

Le recours aux huiles essentielles connues pour posséder des propriétés antioxydantes, antimicrobienne et autres activités biologiques s'avère être un choix pertinent face à un risque de contamination précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques [Caillet et Lacroix., 2007].

Dans ce contexte et dans le but de valoriser le patrimoine forestier Algérien, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'étude des activités biologiques des huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes du pin d'Alep. Le choix de cette espèce s'est fondé sur les propriétés thérapeutiques que possèdent ses huiles essentielles et leur utilisation par les populations humaines pour traiter une variété de maladies. Ces huiles reconnus efficaces contre les affections pulmonaires (la grippe, la sinusite et les rhumatismes), sont aussi utilisés en tant qu'agents hémostatiques, antiseptiques et aphrodisiaques [Ali-Delille., 2010 ; Yaniv et *al.* , 2014].

Cependant très peu de recherches se sont intéressés aux activités biologiques des huiles essentielles du pin d'Alep. Ces travaux portaient surtout sur son activité antimicrobienne [Sadou et *al.*, 2003 ; Abi-Ayad et *al.*, 2011] et antioxydante [Djerrad et *al.*, 2015].

Dans cette optique, nous nous sommes assignés, dans le présent travail, les objectifs suivants :

- Extraction des huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes du pin d'Alep (*Pinus halepensis*).
- Evaluation des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles du pin d'Alep.

- Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles in vitro vis-à-vis des souches microbiennes de référence en la comparant à celle des antibiotiques.
- Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles en la comparant avec celle de l'acide ascorbique.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Pin d'Alep

Le mot Pin est originaire du latin *Pin* qui veut dire parasol. Le Pin d'Alep est aussi connu sous la désignation de Pin de Jérusalem ou de Pin blanc [Rameau et al ., 2008 ; Prévosto., 2013].

*Pinus hierosolimitana* est un nom scientifique qui a été donné à cette espèce par Duhamel en 1755. Philip MILLER a ensuite décrit le pin d'Alep sous le nom de *Pinus halepensis* Mill en 1768 (Nahal, 1962). Cette espèce a été connu localement sous le nom vernaculaire de : Senouber [Ali-Delille, 2010].

Le pin d'Alep est un des arbres les plus caractéristiques des paysages méditerranéens [Prévosto., 2013].

### 1.1. Systématique

Au plan taxonomique, l'espèce *Pinus halepensis* Mill a la systématique suivante [Ozenda, 2006] :

**Règne :** *Plantae*

**Sous-règne :** *Tracheobionta*

**Embranchement :** *Spermaphytes*

**Sous-embranchement :** *Gymnospermes*

**Classe :** *Pinopsida*

**Ordre :** *Coniferales*

**Famille :** *Pinaceae*

**Sous-famille :** *Pinoideae*

**Genre :** *Pinus*

**Espèce:** *Pinus Halepensis*

## 1.2. Description botanique

C'est un arbre macrophanérophyte, sempervirent. Le port est assez élevé (24-45 m maximum) et d'une grande élégance (Figure. 1). Le tronc est souvent sinueux. Le feuillage est relativement clair et léger. La longévité maximale peut atteindre 300 ans, mais l'arbre vit jusqu'à 120-130 ans en moyenne [Seigue., 1985 ; Rameau et al ., 2008 ; Ali-Delille., 2010].



**Figure 1 :** Jeune arbre de *Pinus halepensis* –EL HAOURANE de M'sila [Originale., 2015].

L'écorce est gris argenté, lisse, dans le jeune âge (Figure. 2). En vieillissant le rhytidome (écorce adulte de plus en plus crevassée avec l'âge) apparaît, d'abord écailleux (écailles assez fines, grises) puis crevassé (Figure. 3) [Ali-Delille., 2010].



**Figure 2 :** Écorce du Pin d'Alep jeune avant formation du rhytidome [Ali-Delille., 2010]



**Figure 3 :** Rhytidome du Pin d'Alep vieux, très crevassé [Ali-Delille., 2010]

Les rameaux sont grêles, polycycliques de couleur verte claire la 1<sup>ère</sup> année. Ensuite, ils deviennent faiblement sillonnés, de couleur grise claire (Figure. 4). Il existe des rameaux longs (auxiblastes) et des rameaux nains (brachyblastes) qui constituent les gaines portant les aiguilles [Rameau et *al.* , 2008 ; Ali-Delille., 2010].



**Figure 4 :** Rameaux du pin d'Alep [Ali-Delille., 2010].

Les bourgeons sont cylindriques (Figure. 5), allongés, pourvus d'écaillés brunes non résineux. Les aiguilles sont disposées par deux, fines de 1 mm environ d'épaisseur, filiformes, molles et lisse, de 6 à 10 cm de longueur et de couleur verte jaunâtre (Figure. 6) [Rameau et *al.* , 2008].



**Figure 5 :** Bourgeons végétatifs du pin d'Alep [Ali-Delille., 2010].



**Figure 6 :** Aiguilles du pin d'Alep [Ali-Delille., 2010].



Le pin d'Alep est un arbre à fleurs mâles et femelles séparées (monoïque) situées sur le même individu. Les fleurs sont groupées en épis, les mâles en chatons ovoïdes, roussâtres, de 6-7 mm de longueur, à la base des rameaux de l'année (Figure. 7) et les femelles en petits cônes violacés au sommet des pousses de l'année (Figure. 8) [Rameau et *al* ., 2008].

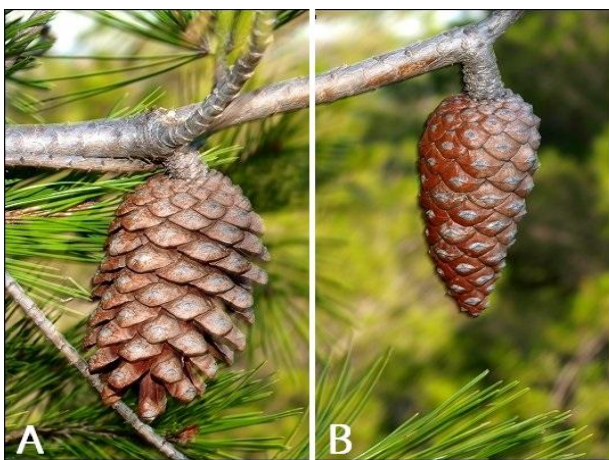


**Figure 7** : Cônes mâles du pin d'Alep [Ali-Delille., 2010].



**Figure 8** : Cônes femelles du pin d'Alep [Ali-Delille., 2010].

Les fruits sont des cônes sérotineux de petite taille (8-12 cm de longueur), solitaire ou verticillés (Figure. 9), portés par un pédoncule épais, réfléchi, apparaissant à l'automne sur les arbres adultes, persistant sur l'arbre plusieurs années. Les écailles sont obovales avec un petit mamelon central. Ils s'écartent à maturité, libérant ainsi des graines longues de 7mm (Figure. 10), mates, présentant une aile 4 fois plus grande, persistante qui permet leur dissémination rapide [Rameau et *al* ., 2008].



**Figure 9** : Cône de pin d'Alep, ouvert (A), fermé (B) [Ali-Delille., 2010].



**Figure 10** : Graine ailée de Pin d'Alep [Original., 2015].

### 1.3. Phénologie et croissance de l'espèce

Les observations phénologiques constituent la méthode la plus importante de l'étude de la relation entre le rythme de développement d'une espèce et les variations écologiques du milieu ambiant. L'étude phénologique du Pin d'Alep entreprise par plusieurs auteurs permet de déceler les observations phénologiques suivantes :

- A. La reprise de la végétation chez le pin d'Alep est relativement tardive et se situe entre février et mars [Serre 1976 a et b ; Nicault et *al.*, 2001].
- B. Les mois de mai et juin correspondent à la période de croissance (radiale et apicale) maximale [Serre 1976 a et b ; Nicault et *al.*, 2001].
- C. La période de croissance est stoppée par la sécheresse vers le mois de juillet [Serre 1976 a et b ; Nicault et *al.*, 2001].
- D. En automne, les rameaux ne semblent s'allonger que très peu [Serre, 1976 b], la croissance radiale par contre reprend de façon significative [Nicault et *al.*, 2001].
- E. Le Pin d'Alep est un arbre polycyclique, susceptible d'effectuer plusieurs pousses par an et de produire des faux cernes [Serre, 1976].
- F. Les cônes mûrissent au cours de la deuxième année et laisse le plus souvent échapper leurs graines au cours de la troisième année [Nahal, 1962 ; Francelet, 1970].
- G. La dissémination naturelle des graines a lieu entre la fin du mois d'août et la fin du mois d'octobre. Le cône doit avoir subi de fortes chaleurs, qui détruisent les joints de résine entre les écailles, pour pouvoir s'ouvrir [Francelet, 1970].
- H. La germination peut avoir lieu, soit à la fin de l'automne, soit au début du printemps [Calamassi et *al.*, 1984].
- I. Le Pin d'Alep fructifie dès l'âge de 10 à 12 ans, mais les graines qu'il produit ne sont aptes à germer que lorsqu'il a atteint l'âge de 18 à 20 ans [Nahal, 1962].
- J. D'après Nahal [1962], 100 kg de cônes produisent à peu près 50 kg de graines ailées, 1 kg de graines comptant environ 50.000 graines. De plus, les graines conservent leur pouvoir germinatif pendant au moins deux ans.

## 1.4. Distribution phytogéographique

### 1.4.1 Dans le monde

La répartition du Pin d'Alep est méditerranéenne-occidentale [Nahal., 1962 ; Quezel., 1980].

Il est intéressant de signaler que ce Pin n'existe pas à l'état naturel dans la région d'Alep, au nord de la Syrie. Le pin qu'on trouve à l'état spontané dans cette région est un pin voisin, le Pin brutia, avec lequel il a été confondu [Nahal., 1986].

C'est incontestablement au Maghreb qu'il offre son développement maximal (Figure. 11), puisqu'il est présent pratiquement partout, du bord de mer jusqu'aux massifs présahariens. Toutefois, pour des raisons écologiques, il fait défaut au Maroc atlantique et sur le littoral humide de Kabylie et de Khroumirie (Tunisie) [Quezel et Medail., 2003].



**Figure 11** : Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne [Fady et al., 2003]

### 1.4.2 En Algérie

En l'Algérie, l'aire de répartition de *Pinus halepensis* s'étend essentiellement dans la partie septentrionale du pays. C'est ainsi qu'il occupe de vastes peuplements en Oranie (Sidi-Bel-Abbes, Saida, Tlemcen, Tiaret, Ouarsenis) sur le Tell algérois (Médéa, Bibans), sur l'Atlas saharien (Monts des Ouleds Nails). Dans le Constantinois, il est surtout localisé dans les Aurès et les Monts de Tébessa où il rejoint la Tunisie (Figure. 12) [Kadik., 1987].

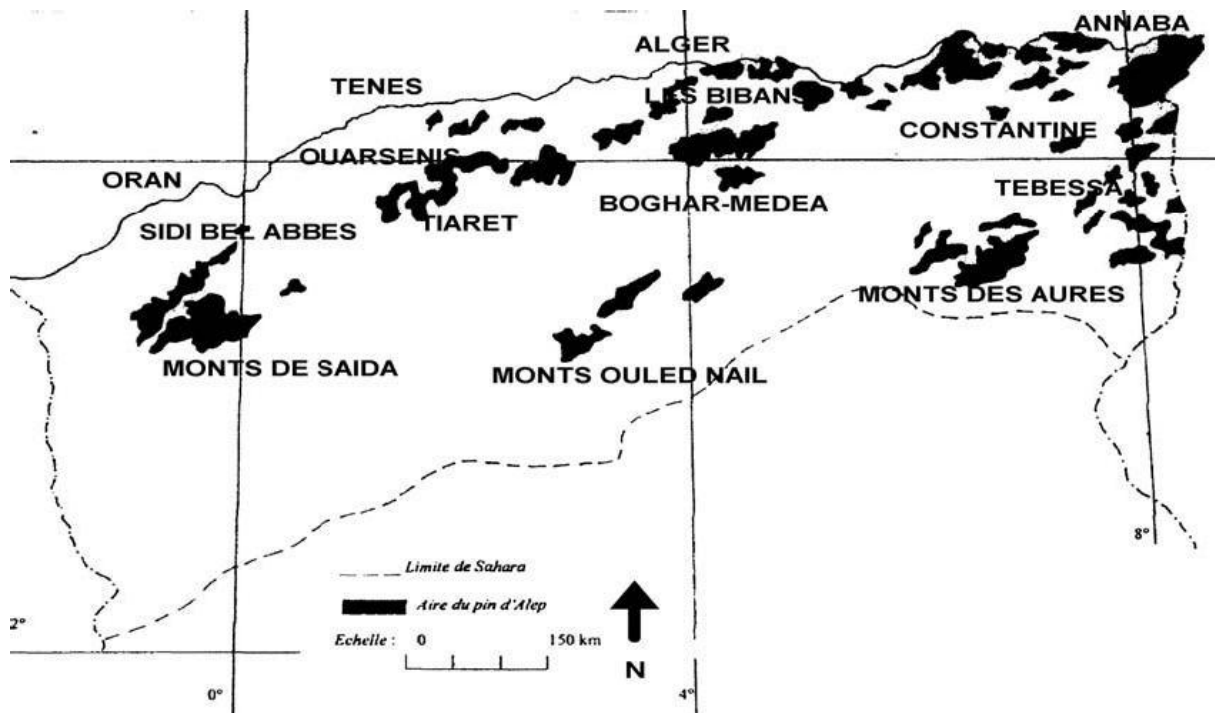


Figure 12 : Aire de répartition du Pin d'Alep en Algérie [Kadik., 1987].

## 2. Huiles essentielles

### 2.1. Définition

Ce sont des mélanges complexes de substances volatiles obtenues à partir des végétaux [Catier et Roux., 2007 ; Milpied., 2009]. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire, et sont responsables de leurs odeurs caractéristiques [Bruneton., 1993 ; Sanon et *al.*, 2002].

Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante [Bernard et *al.*, 1988 ; Anton et Lobstein., 2005].

### 2.2. Lieux de synthèse des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des structures histologiques spécialisées [Deysson, 1978 ; Salle, 1991]. Les huiles essentielles peuvent être extraites des feuilles, des fleurs, des bourgeons, des graines, des fruits, des racines, du bois ou d'écorce de plantes [Thormar, 2010].

Cependant seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées en huiles essentielles de la plante sont récoltées durant la période où le rendement est optimal [Deysson, 1978].

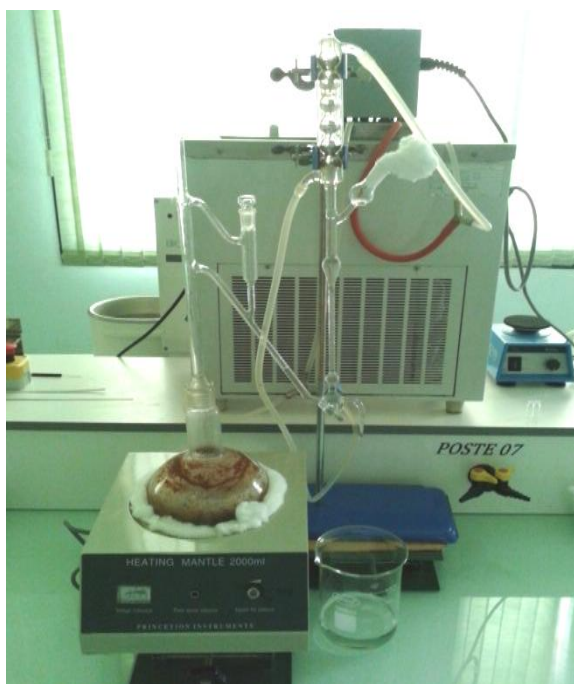
### 2.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des huiles essentielles intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique [Garnero, 1977].

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

#### 2.3.1 Hydrodistillation

C'est la méthode la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles à l'état pur avec les meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition (Figure.13), les vapeurs hétérogènes se condensent sur une surface froide et l'huile essentielle est alors séparée par différence de densité [Bruneton., 1993]. L'extraction qui s'effectue à température élevée durant une période plus au moins longue peut engendrer des réactions secondaires au sein de l'huile essentielle à savoir : hydrolyse, cyclisation et réarrangement [Benhabiles., 1995].



**Figure 13 :** Montage d'extraction par Hydrodistillation [Originale., 2013].

### 2.3.2 Entraînement à la vapeur d'eau

A la différence de l'Hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Ce procédé se fait à l'aide d'un montage à distillation simple.

La vapeur d'eau traverse la matière végétale. 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 séparé. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [Meyer-Warnod, 1984 ; Auclair et Côté, 2002].

### 2.3.3 Hydro diffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Cette technique est relativement récente et particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau à travers la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydro-diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation [Wison., 2002].

### 2.3.4 Hydrodistillation par micro-onde

Le processus d'Hydrodistillation par micro-ondes, est basé entièrement sur le principe d'Hydrodistillation classique. La matière végétale est installée avec l'eau dans un ballon qui a déjà été placé à l'intérieur du four à micro-ondes. Le système de refroidissement et la partie estimée pour récupérer l'essence sont situés à l'extérieur du four. L'opération dure 30 min [Chemat et Cravotto., 2013].

### 2.3.5 Expression à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique [Roux et *al.*, 2008].

## 2.4. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est complexe, on trouve généralement de nombreux constituants dans une huile essentielle appartenant principalement à deux grands groupes chimiques ; les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [Catier et Roux., 2007].

Selon Franchomme et *al* [1990] et Mailhebiau [1994], la structure des composants des huiles essentielles varie en fonction :

- . du nombre d'atomes de carbone qui les constitue : Les monoterpènes, Les sesquiterpènes, Rarement les Diterpènes.
- . du caractère saturé ou insaturé des liaisons.
- . de leur agencement : linéaire ou cyclique.
- . de la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...),
- . de la nature des groupes fonctionnels, à savoir :

### 2.4.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence d'unité isoprénique à cinq atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) dans leur squelette. Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en:

**Monoterpènes:** formés de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ) qui sont volatils entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable. Ils représentent la majorité des constituants des

huiles essentielles, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques.

**Sesquiterpènes** : formés de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ), il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 300 molécules.

**Diterpènes** : formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ )

Il faut noter que les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide...) [Bruneton, 1999 ; Hernandez-Ochoa, 2005].

#### 2.4.2. Composées aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes. Cette classe comprend des composés odorants.

#### 2.5. Rôle physiologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs [Deroin, 1988]. De plus, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises dans ce dernier cas sont appelées « phytoalexines » [Mann, 1987].

#### 2.6. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

Malgré leur différence de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physicochimiques :

Elles sont généralement liquides aux températures ordinaires, volatiles et entraînaibles à la vapeur d'eau, d'odeurs aromatiques, rarement colorées quand elles sont fraîches. Leur densité est généralement inférieure à 1. Elles sont peu solubles dans l'eau et solubles dans la plupart des solvants organiques. Elles ont un indice de réfraction élevé et le plus souvent, sont dotés d'un pouvoir rotatoire. Elles sont sensibles à l'oxydation et donc leur conservation est limitée.

Leur conservation se fait dans des petits flacons opaques, bien fermés et si possible à basse température [Guenther, 1975 ; Catier et Roux., 2007].

#### 2.7. Propriétés biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne [Pellecuer., 1980] et d'origine fongique [Chaumont et Leger., 1989]. Elles ont chacune des propriétés spécifiques: calmante, antidouleurs, tonique, circulatoire, antifatigue, régénératrice de la peau, amincissante, carminative, émolliente, adoucissante [Grosjean., 2007].

Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques [Sivropoulou et al., 1996] qui les rapprochent donc des antiseptiques et des désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.



Traditionnellement les huiles essentielles ont été utilisées dans trois grands domaines de pathologie : dermatologie, affections ORL (Oto-Rhino-Laryngologie) et troubles gastro-intestinaux. On les utilisait souvent sous forme de tisanes, ou sous la forme de préparations galéniques simples [Catier et Roux., 2007].

On peut utiliser les huiles essentielles par différentes voies : buccale, rectale, nasale ou cutanée. Elles peuvent donc pénétrer dans notre corps pour atteindre la circulation sanguine afin d'être acheminées jusqu'au site malade [Festy., 2009].

D'autres propriétés biologiques des huiles essentielles sont exploitées dans les préparations pharmaceutiques ; leurs activités anti-inflammatoire, cicatrisante, antioxydante, veinotonique et astringente [Roux et *al.*, 2007].

### 2.8. Toxicité

L'évaluation de la toxicité est importante lorsque l'huile essentielle est utilisée comme médicament dans le cadre de l'aromathérapie. Les risques de toxicité aiguë sont liés en particulier à la neurotoxicité des huiles essentielles qui contiennent des cétones (thuyone, pinocamphone) et certains monoterpènes qui sont également toxiques à fortes doses tels le camphre et le menthol [Catier et Roux., 2007].

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature :

. **Toxicité par ingestion** : En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5 g/kg par voie orale [Bruneton., 1999].

. **Toxicité dermique** : Le large usage que font la parfumerie et la cosmétique des huiles essentielles a suscité de nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aiguë ou chronique) par application locale [Pibiri., 2006].

### 2.9. Huiles essentielles du pin d'Alep

Dès l'Antiquité, les populations humaines autour de la Méditerranée utilisaient l'huile essentielle du pin d'Alep pour traiter une variété des maladies telles que l'écoulement nasal, l'accident vasculaire cérébral, la léthargie, la dépression, les hémorragies intérieures et les blessures externes en tant qu'agent hémostatique, les maux des plaies, ainsi comme un agent aphrodisiaque [Yaniv et *al.*, 2014].

Les huiles essentielles du pin d'Alep sont aussi utilisées comme [Ali-Delille, 2010]:

- Antiseptiques puissants recommandées dans toutes les infections des voies respiratoires, les infections urinaires et les calculs biliaires.

- Rubéfiants et balsamiques, efficaces dans les affections pulmonaires: la grippe, la sinusite et les rhumatismes.

### 3. Activité antioxydante

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions destructrices en chaînes. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres en annulant ainsi leur action. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques dans le cas des huiles essentielles et des dérivées de Phénol [Berset et Cervelier., 1996].

#### 6.1. Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par Halliwell [1999], comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres [Gunstone et Norris., 1983].

#### 6.2. Antioxydants naturels

Les antioxydants d'origine naturelle sont des produits extraits de plantes et en particulier d'épices [Chevolleau., 1990, Vardar-Unlu et *al.*, 2003, Skerget et *al.*, 2005, Lee et *al.*, 2005, Küçük et *al.*, 2007, Tomaino et *al.*, 2005]. Les molécules actives sont soit des flavonoïdes (quercétine, myricétine,...), soit des dérivés de l'acide benzoïque (acide vanillique, acide syringique,...) soit des dérivés de l'acide cinnamique (acide caféique, acide rosmarinique, ...) ou des composés phénoliques (thymol, carvacrol, ...) [DasetPreira., 1990, Chevolleau., 1990, Pokorny., 1991, Schwarz et Ternes., 1992, Crapisteetal., 1999, Tepe et *al.*, 2006].

De nombreuses études ont montré que les huiles essentielles sont douées d'une activité antioxydante [Belhadj et *al.*, 2006; Chaieb et *al.*, 2007]. Cette activité est attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques et quelques monoterpènes hydrocarbonés tels que le  $\alpha$ -terpinène, le  $\gamma$ -terpinène et l' $\alpha$ -terpinolène [Edris, 2007; Masson., 2007; Aydin et *al.*, 2013].

Le recours aux huiles essentielles connues pour posséder ces propriétés antioxydantes s'avère être un choix pertinent face à un risque de contamination précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques [Caillet et Lacroix., 2007].

#### 4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives. L'efficacité d'une huile essentielle dépend de sa richesse en certains composés phytochimiques. Plus l'huile essentielle est riche en substances actives, plus son activité est importante [Zhiri., 2006].

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée aux groupements fonctionnels des composées majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétonique). Les composées minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des huiles essentielles et semblent agir en synergie avec les composées majoritaires [Zhiri., 2006].

Les composées chimiques qui ont plus d'efficacité à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools ( $\alpha$ -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes [Dorman et Deans., 2000].

##### 4.1. Mécanismes d'action antibactérienne

Les mécanismes par les quels les huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur leur mode d'action. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [Dorman et Deans., 2000].

BURT [2004] a avancé que la caractéristique importante des huiles essentielles est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales des ions, voire même des macromolécules.

Le mode d'action des huiles essentielles dépend du type de microorganismes. En générale, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatives est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer [Cristiani et al ., 2007].

## **MATERIEL ET METHODES**

Nos essais expérimentaux se sont étalés sur une période de deux mois, de avril à mai 2016. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- ❖ Laboratoire de Projets de Fin d'Etude (PFE), département de biologie, faculté des sciences et sciences de l'ingénieur, Université Mohamed Boudiaf, M'sila.
- ❖ Unités de développement et des contrôles Physico-chimique et Microbiologique du complexe Antibiotical de SAIDAL (Médéa).
- ❖ Annexe de l'Institut Pasteur d'Algérie, M'Sila.

## 1. Matériel

### 1.1 Matériel biologique

#### 1.1.1. Matériel végétal

La récolte des aiguilles, des branches, et des cônes femelles âgés de deux ans de l'espèce *Pinus halepensis* a été réalisée en début de matinée au mois d'Avril 2016.

La zone d'étude EL-Haourane fait partie de la forêt domaniale de Dréat, qui comprend 23 cantons (superficie totale : 16879 ha). Elle est localisée au Nord de la commune de hammam Dalaâ à environ 15 Km et s'étend sur une superficie de 994,56 ha, soit 5,9 % de la superficie totale de la forêt de Dréat ; limitée au Nord par le canton d'Ogribissa, à l'Est par Douar Dréat, à l'ouest par le canton de Sidi Amar et le canton de Mechrarine, et au sud par le canton Boustéila.

L'identification a été faite selon les clés de détermination de Quezel et Santa [1963], puis elle a été confirmée au niveau du Jardin d'Essais d'El Hama (Alger) suite à une comparaison avec les spécimens de l'herbier.

Les aiguilles, les branches et les cônes femelles fraîchement récoltés ont été broyés grossièrement (Figure. 14).



**Figure 14** : Matériel végétal : Aiguilles (A), Branches (B), Cônes (C) [Original., 2016].

### 1.1.2. Microorganismes utilisés

Le choix des microorganismes a été porté sur six souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) fréquentes en pathologie humaine. Certaines d'entre eux sont souvent responsables de toxi-infections alimentaires constituant ainsi un problème majeur de santé publique, et sont caractérisées par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens.

Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries, une levure et un champignon :

- Des bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 65 38, *Bacillus subtilis* ATCC 66 33.
- Des bactéries Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90 27, *Escherichia coli* ATCC 87 39.
- Une levure : *Candida albicans* ATCC 10 231.
- Un champignon : *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16 404.

Ces souches nous ont été fournies sous forme lyophilisées par les responsables du laboratoire de Microbiologie du complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa.

#### Matériel non biologique

Des antibiotiques et des antifongiques ont été utilisés comme références (témoins positifs). Les équipements, la verrerie et les milieux de culture utilisés sont mentionnés dans l'Annexe 1 et 2.

## 2. Méthodes

### 2.1 Extraction des huiles essentielles

La méthode d'extraction des huiles essentielles utilisée au cours de notre expérimentation est l'Hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type « Clevenger ». C'est la méthode préconisée par la Pharmacopée Européenne [Ph. Eur6., 2008]. Cette technique courante permet de séparer les huiles essentielles à l'état pur et de fournir de meilleurs rendements.

La matière végétale (150 g pour les aiguilles et le branches et 200 g pour les cônes), a été introduite dans un ballon de 1 L contenant de l'eau (600 ml). Ce dernier a été ensuite mis à ébullition pendant 4 heures. La distillation a été effectuée avec un recyclage communément appelé cohobage tel que c'est décrit dans la Pharmacopée Européenne.

Les huiles essentielles extraites ont été pesées pour le calcul du rendement, et conservées à une température voisine de 4°C, dans des flacons en verre opaque de 5 ml, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont les principaux agents de dégradation [Kaloustian et al., 2013].

## 2.2 Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau de nos échantillons de poids déterminé (4 g), a été déterminée par le procédé de dessiccation à une température de 70° C dans une étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant [Zerrad et *al.*, 2006].

Considérons :

$x$  : poids de l'échantillon

$y$  : poids de l'échantillon après déshydratation

$T\%$  : Teneur en eau exprimé en pourcentage

$$T\% = \frac{x - y}{x} \times 100$$

## 2.3 Étude de la cinétique d'extraction

La cinétique d'extraction consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie.

Pour étudier la cinétique d'extraction des huiles essentielles des aiguilles, des branches et des Cônes de *Pinus halepensis* à l'état frais, nous avons récupéré des quantités de l'huile essentielle de chaque partie correspondantes à des intervalles de temps de 15 mn qui s'étalent de 0 à 300 minutes. Les quantités des huiles essentielles obtenues ont été exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps.

## 2.4 Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière végétale sèche [Afnor., 2000]. Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile récupérée et la masse de la matière végétale. Le rendement en huile essentielle, exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante :

$$R = \frac{m_{HE}}{m_V} \times 100$$

$R$  : rendement en huile essentielle en %

$m_{HE}$  : la masse de l'huile essentielle récupérée en gramme

$m_V$  : la masse de la matière végétale sèche en gramme

## 2.1 Étude analytique des huiles essentielles

### 2.5.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) des huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes ont été notées par les spécialistes de SAIDAL.

### 2.5.2. Indices physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles ont été déterminées selon des protocoles précis et obéissants à des normes édictées par l'organisation internationale de normalisation et par la Pharmacopée Européenne [Afnor., 2000; Ph. Eur6., 2008].

#### 2.5.2.1. Caractères physiques

##### ❖ Densité relative à 20°C

La densité relative  $d_{20}^{20}$  d'une substance est le rapport entre la masse d'un volume donné de cette substance et la masse d'un volume égal d'eau à 20°C [Ph. Eur6., 2008].

#### Mode opératoire

Un volume de 1 ml de chaque huile essentielle a été prélevé à l'aide d'une micropipette et pesé avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de correction de température [NF ISO 279. 1999]:

$$d_{20}^{20} = \left( \frac{m_{HE}}{m_{H_2O}} \right) + (0,00073 \times (T^{\circ}_{Ech} - 20))$$

Où

$m$  : masse en gramme

$T$  : température en °C

##### ❖ Indice de réfraction à 20 °C

C'est le rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air au sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré [Ph. Eur6., 2008].

#### Mode opératoire

Le réfractomètre a été réglé en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à une température de 20°C. Après ouverture du prisme secondaire, une goutte de chaque huile essentielle a été déposée sur la partie centrale du prisme principal. Par la suite nous avons fermé délicatement le prisme secondaire.

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil du type aus JENA. La mesure a été faite à une température ( $T$ ) différente de 20 °C, puis elle a été corrigée par l'introduction du coefficient de correction de température en appliquant la formule suivante [NF ISO 280 75 -11]:



$$I_{20} = I_t + 0,00045(T - 20^\circ\text{C})$$

$I_{20}$  : indice à 20°C

$I_t$  : indice à la température ambiante

$T$  : Température ambiante.

#### ❖ Mesure de la miscibilité à l'éthanol

La miscibilité des huiles essentielles a été déterminée dans de l'éthanol à 90°. Selon le protocole suivant [Ph. Eur6., 2008] ;

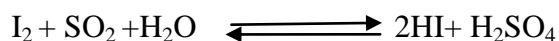
Dans une éprouvette de 30 ml à bouchon rodé placée dans un thermostat à  $20 \pm 0,2$  °C, nous avons introduit 1,0 ml de l'huile essentielle à examiner. A l'aide d'une burette de 20 ml nous avons ajouté des fractions de 0,1 ml d'éthanol à 90° jusqu'à dissolution complète en agitant fréquemment. Puis nous avons noté le volume d'alcool utilisé lors de l'obtention d'une solution limpide.

Une huile essentielle est dite soluble dans  $n$  volume ou plus d'alcool d'un titre donné  $t$ .

#### 2.5.2.2. Caractères chimiques

##### ❖ Détermination du taux d'humidité Karl Fisher KF

Selon ALLEMAN [1983] La méthode repose sur la faculté de l'iode à réagir avec l'eau en présence du dioxyde de soufre :



C'est un protocole d'analyse chimique basé sur l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode dans une solution d'hydroxyde de méthane. En principe, la réaction produite est :



#### Mode opératoire

La détermination du taux d'humidité des huiles essentielles a été faite selon la méthode de Karl Fischer qui consiste à ajouter avec une seringue une petite quantité d'huile essentielle dans le réacteur de KF, l'appareil détermine le volume du réactif de KF utilisé en millilitres [NF ISO 11021].

Le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$KF = \frac{v}{m_{Ech}} \times f_{KF} \times 100$$

$KF$  : taux d'humidité Karl Fisher

$V$  : volume en millilitres du réactif de KF utilisé

$f_{KF}$ : facteur de réactif KF (calculé expérimentalement, détail dans l'Annexe 3)

$m_{Ech}$ : masse en milligramme de l'échantillon

#### ❖ Mesure du potentiel d'Hydrogène (pH)

La détermination potentiométrique du pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre par mesure de la différence de potentiel entre 2 électrodes judicieusement choisies plongeant dans l'huile essentielle [Lehir et Cohen., 2001].

#### ❖ Mesure du taux des composés carbonylés exprimés en C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O

La méthode utilisée est celle décrite dans la Pharmacopée Européenne [Ph. Eur3., 2001]. Dont le but est de déterminer la richesse de nos huiles essentielles en monoterpènes.

### Mode opératoire

Nous avons Mélangé 1g de chaque huile essentielle avec 20 ml d'Ethanol. Puis nous avons ajouté 10 ml de solution de Chlorhydrate d'hydroxylamine et 0,4 ml de solution de Bleu de Bromophénol. Le tout a été ensuite titré lentement par l'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 M jusqu'au virage de l'indicateur du jaune au vert-olive. Après un repos de 5 min, le titrage est refait de nouveau, si nécessaire jusqu'au virage de l'indicateur du jaune au vert-olive. En fin nous avons effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions.

1 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique à 0,5 molaire correspond à 76,1 mg de composés carbonylés exprimés en C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O.

Le taux est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$T_{carb} = \frac{(V_{Ech} - V_0)}{P} \times eq \times f_{KOH} \times 100$$

$T_{carb}$ : taux des composés carbonylés %

$V_{Ech}$ : volume (ml) de KOH alcoolique utilisé pour le titrage de l'échantillon

$V_0$ : volume (ml) de KOH alcoolique utilisé pour le titrage du blanc

$P$ : masse (mg) de l'échantillon

$eq$ : équivalent gramme exprimé en mg/ml (c'est la masse molaire des composés carbonylés, titrés, multipliée par la molarité de la solution titrant)

$f_{KOH}$ : facteur de correction (calculé expérimentalement, détail dans l'Annexe 3).

### ❖ Détermination de l'indice de peroxyde

L'indice de peroxyde  $I_p$  est le nombre qui exprime en milliéquivalents d'oxygène actif la quantité de peroxyde contenue dans 1000 g de substance.

#### Principe

On traite les corps gras en solution dans l'acide acétique et du chloroforme par une solution d'iodure de potassium. On titre par la suite l'iode libéré par une solution de thiosulfate de sodium (0,01 N).

#### Mode opératoire

Dans une fiole conique de 250 ml à bouchon rodé, nous avons introduit 1 g de la substance à examiner. Puis, nous avons ajouté 30 ml d'un mélange de 2 volumes de chloroforme et de 3 volumes d'acide acétique glacial. Après agitation jusqu'à dissolution de l'échantillon, nous avons ajouté 0,5 ml de solution saturée d'iodure de potassium. Suite à une agitation pendant 1 min, nous avons ajouté 30 ml d'eau, puis titré par le thiosulfate de sodium 0,01 M qui a été ajouté lentement, sans cesser d'agiter énergiquement, jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu. Ensuite nous avons ajouté 5 ml de solution d'amidon et continué le titrage en agitant énergiquement jusqu'à disparition de la coloration ( $n_1$  ml de thiosulfate de sodium 0,01 M). En fin nous avons effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions ( $n_2$  ml de thiosulfate de sodium 0,01 M). Le titrage de l'essai à blanc ne doit pas consommer plus de 0,1 ml de thiosulfate de sodium 0,01 M [Ph. Eur6., 2008].

$$I_p = \frac{(n_1 - n_2) \times 10}{m} \times f_{thiosul}$$

$I_p$  : l'indice de peroxyde

$n_1$  : volume (ml) de thiosulfate de sodium utilisé pour l'échantillon

$n_2$  : volume (ml) de thiosulfate de sodium utilisé pour le blanc

$m$  : masse (mg) de l'échantillon

$f_{thiosul}$  : facteur de normalité exact de la solution de thiosulfate utilisé (calculé expérimentalement, détail dans l'Annexe 3).

### ❖ Détermination de l'indice d'acide

L'indice d'acide  $I_A$  est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance.

#### Mode opératoire

Une quantité de 1 g de chaque huile essentielle à tester a été dissoute dans 30 ml d'éthanol à 96%, neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0,02 M en présence de 0,5 ml de solution de rouge de phénol. Nous avons titré par l'hydroxyde de potassium 0,02 M jusqu'à ce que la couleur rose persiste pendant au moins 15 s ( $n$  ml de réactif titrant KOH).

Le contenu du ballon a été mis en réserve pour les analyses ultérieures (indice d'ester). L'indice d'acide est donné par la relation suivante [Ph. Eur 6., 2008] :

$$I_A = \frac{v \times n \times 56,11}{m} \times f_{KOH}$$

$I_A$  : L'indice d'acide

$v$  : le volume (ml) de potasse employé

$n$  : la normalité de la solution

$m$  : la masse (mg) de la prise d'essai

$f_{KOH}$  : facteur de correction (calculé expérimentalement, détail dans l'Annexe 3)

### ❖ Détermination de l'indice d'ester

L'indice d'esters  $I_E$  est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1 g de substance.

#### Mode opératoire

Dans trois fiole de 250 ml de verre borosilicaté et munies d'un réfrigérant à reflux, nous avons introduit les solutions provenant de la détermination de l'indice d'acide. Puis, nous avons ajouté 25 ml d'hydroxyde de potassium 0,5 M et quelques billes de verre. Ensuite, nous avons adapté le réfrigérant et chauffé à reflux pendant une heure. Après refroidissement des fioles. Nous avons ajouté 20 ml d'eau puis 5 gouttes de solution de rouge de phénol. Le titrage de l'excès de KOH a été effectué avec une solution d'acide chlorhydrique 0,5 M.

Un essai à blanc dans les mêmes conditions a été réalisé. L'indice d'ester est calculé par l'équation suivante [Ph. Eur 6., 2008] :

$$I_E = 28,05 \times (v_0 - v_1) \times f_{HCl}$$

$I_E$ : L'indice d'ester

$I_0$ : Le volume (ml) d'acide chlorhydrique employé pour le blanc

$I_1$ : Le volume (ml) d'acide chlorhydrique employé pour l'échantillon

$f_{HCl}$ : facteur de correction (calculé expérimentalement, détail dans l'Annexe 3).

## 2.2 Étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'identification des souches que nous avons utilisées a été au préalable confirmée par les services de Microbiologie du complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa, et de l'Institut Pasteur.

Nous avons tenu à vérifier leur pureté par l'examen des caractéristiques cellulaires et les tests biochimiques et culturaux. Les tests réalisés sont mentionnés dans l'Annexe 4.

Après leur confirmation, les souches sont conservées dans des tubes de gélose en piqure centrale jusqu'à leur utilisation.

### 2.6.1. Préparation de l'inoculum

#### ❖ Préparation de pré-cultures

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce dans un milieu liquide (bouillon Trypticase Soja pour les bactéries et bouillon Sabouraud pour la levure et le champignon). Après incubation pendant 24h à 37°C pour les bactéries et 48 à 72h à 25°C pour la levure et le champignon, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de Pétrie contenant de la gélose Trypticase Soja pour les bactéries et gélose Sabouraud pour la levure et le champignon. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24h.

#### ❖ Préparation des suspensions

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18 h qui ont été mises ensuite dans 5 ml d'eau physiologique stérile. Le mélange a été agité au vortex pendant quelques secondes.

La méthode de préparation de l'inoculum pour la levure et le champignon est la même que celle utilisée pour les bactéries sauf que la culture doit être âgée de 48 h.

Les concentrations des inoculums sont évaluées par leur turbidité et sont exprimées par la mesure de la Densité Optique (DO à 620 nm) sur un spectrophotomètre. Selon Mac Farland [1907], on admet qu'une DO comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  UFC/ml pour les bactéries. Une densité de 0.12-0.15 correspond à  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml pour les levures et les champignons. La standardisation des suspensions à

une DO = 0,92 nm pour les bactéries et 0,14 nm pour la levure et le champignon est réalisée en diluant les suspensions à l'eau physiologique stérile.

### 2.6.2. Test *in vitro*

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé appelée aromatogramme en utilisant des disques stériles en cellulose [Benjelali., 1986].

#### ❖ Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet des huiles essentielles. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'huile essentielle.

Nous avons utilisé sept antibiotiques différents [Fusidic Acid (FA) 10 $\mu$ g, Ofloxacin 5 $\mu$ g (Ofx), Imipenem (IPM) 10  $\mu$ g, Nitrofurantoin 300 $\mu$ g (FT 300)], et un antifongique [Nystatine 100 $\mu$ g (Nys 100)]. Le choix a été fait en fonction de la disponibilité.

#### ❖ Test de sensibilité aux huiles essentielles : Aromatogramme

Nous avons utilisé la gélose aux peptones de caséine et de soja (TSA) pour les bactéries et la gélose Sabouraud au chloramphénicol pour la levure et le champignon. Le milieu de culture gélosé en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à raison de 15 ml par boîte.

L'ensemencement a été réalisé en écouvillonnant trois fois toute la surface de la gélose en faisant tourner la boîte de 60° à chaque fois pour assurer une répartition uniforme de l'inoculum (ensemencement en nappe).

Pour tester la sensibilité de chaque souche à chaque huile essentielle étudiée, une boîte a été ensemencée.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de cellulose stérile sont déposés à la surface de la gélose ensemencée à raison de trois disques par boîte. Chaque disque est ensuite imprégné d'une quantité de 10  $\mu$ l de l'huile essentielle. Les boîtes de Pétrie sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30mn, et mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, et à 25°C pendant 5 jours pour la levure et le champignon.

L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.

### 2.6.3. Expression des résultats

Les résultats des aromatogrammes sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions, en millimètre. Cette mesure est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité antimicrobienne (Tableau I).

**Tableau I :** Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition pour des disques imprégnés de 10 µl d'huile essentielle [Belaiche, 1979].

INHIBITION* mm	TRANSCRIPTION	SENSIBILITE
0	0	Résistant
<5	±	Peu sensible
>10	+	Sensible
20 à 30	++	Assez sensible
> 30	+++	Très sensible

\* valeur du diamètre du disque imbibé soustraite

Afin de comparer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées avec celle des antibiotiques utilisés, nous avons vérifié la relation de proportionnalité entre l'activité (la surface d'inhibition  $z'$ ) et la quantité d'agent antimicrobien ( $q$ ). Le coefficient d'activité  $A$  pour chaque souche bactérienne est estimé [Pibiri., 2006].

$$A = \frac{z'}{q}$$

Avec ;

$$z' = \pi (z^2 / 4)$$

$z'$  : la surface d'inhibition

$q$  : la quantité d'agent antimicrobien (en µg)

$z$ : le diamètre d'inhibition (cm), diamètre du disque imbibé inclus

### 2.3 Évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH\*(1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles a été estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse (acide ascorbique). Nous avons utilisé la méthode mise au point par Bentabet et *al* [2008].

Une solution de 0,0025% (2,5 mg/ 100 ml) de DPPH dilué dans le méthanol a été préparée et stockée dans l'obscurité jusqu'à son utilisation. La solution donne une couleur violet.

Pour vérifier la qualité de notre préparation et pour mieux préciser les valeurs d'absorbances, un balayage spectrophotométrique de la solution méthanolique du DPPH préparée a été réalisé en variant la longueur d'onde et en mesurant l'absorbance correspondante afin de déduire la longueur d'onde maximale ( $\lambda_{\max}$  pour une absorption maximale).

Un volume de 50  $\mu$ l de différentes concentrations de chaque huile essentielle (de 80 à 896  $\mu$ g/mL dans le Méthanol) est ajouté à 1950  $\mu$ l de la solution méthanolique du DPPH (0,025 mg/ml) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50  $\mu$ l du méthanol avec 1950  $\mu$ l d'une solution méthanolique de DPPH.

Une expérience de contrôle a été effectuée en utilisant l'acide ascorbique dont les concentrations varient entre 20 et 200  $\mu$ g/ml.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à  $\lambda_{\max} = 515,5$  nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japan), contre un blanc pour chaque concentration qui contient 50  $\mu$ l de chaque concentration de l'huile essentielle à tester et 1950  $\mu$ l du méthanol.

#### 2.7.1. Expression des résultats

##### ❖ Calcul des pourcentages d'inhibitions

Le pourcentage d'inhibition du DPPH ( $I\%$ ) est calculé selon l'équation suivante :

$$I\% = \frac{Abs_C - Abs_E}{Abs_C} \times 100$$

$I\%$  : Le pourcentage d'inhibition du DPPH

$Abs_C$  : Absorbance du contrôle négatif

$Abs_E$  : Absorbance de l'échantillon.



**❖ Détermination de concentration inhibitrice de 50 % IC<sub>50</sub>**

IC<sub>50</sub> ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC<sub>50</sub>: Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des huiles essentielles et l'acide Ascorbique.

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, la cinétique de réduction du DPPH est suivie au cours du temps avec une concentration d'antioxydant (huiles essentielles et acide ascorbique) égale à IC<sub>50</sub> jusqu'à l'obtention d'un plateau au temps final. Le paramètre TEC<sub>50</sub> est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC<sub>50</sub>. Ce temps est calculé graphiquement [Sharififar et *al.*, 2007].

Les deux facteurs IC<sub>50</sub> et TE<sub>50</sub> sont combinés afin d'obtenir le paramètre d'efficacité anti-radicalaire [Sharififar et *al.*, 2007].

$$E_A = \frac{1}{IC_{50} \times TE_{50}}$$

IC<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice de 50 % exprimée en mg d'antioxydant par g de DPPH (mg AO/ g DPPH).

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## 1. Détermination du rendement d'extraction

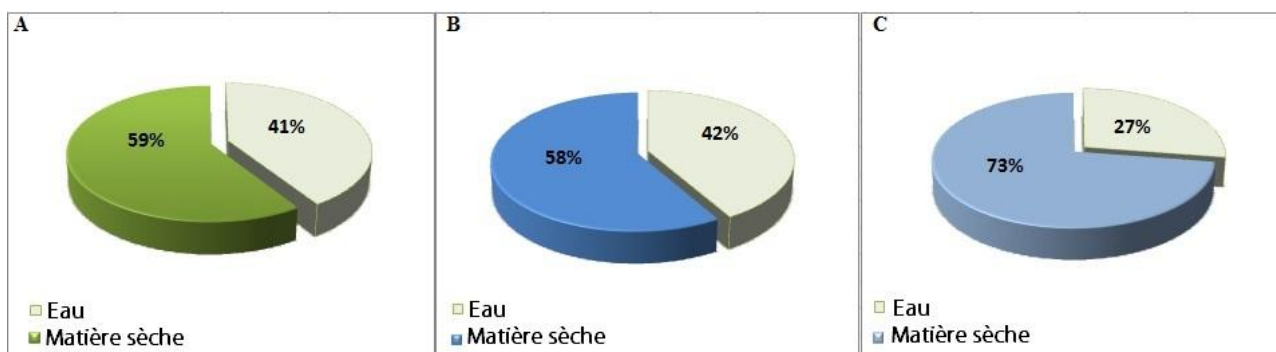
### 1.1. Teneur en eau

Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau des aiguilles, des branches et des cônes de l'espèce *Pinus halepensis*. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

Les résultats de cette analyse ont révélé une teneur en eau égale à  $41\% \pm 0,18$  pour les aiguilles,  $41,61\% \pm 0,96$  pour les branches et  $27,43\% \pm 0,05$  pour les cônes (le détail du calcul de la teneur en eau est mentionné dans l'Annexe 5) (Figure 13).

La teneur en eau des aiguilles et des branches des conifères se situe en moyenne entre 24% et 47%, Cependant elle varie en fonction de nombreux facteurs comme l'écologie des plantes, la période de la récolte et l'âge du sujet [Hamilton et al., 2000],

Selon Hamilton et al., [2000], chez les conifères, La déshydratation est un facteur significatif de désarticulation des cônes, les cônes morphologiquement matures, ne contiennent pas plus que 30 % d'eau, cela confirme la maturité physiologique des cônes récoltés dans notre étude.



**Figure 15 :** Teneur en eau des Aiguilles (A), des Branches (B) et des Cônes (C), frais de *Pinus halepensis*.

### 1.2. Rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles des différentes parties du pin d'Alep ( $1,34\% \pm 0,01$  pour les aiguilles,  $0,63\% \pm 0,007$  pour les branches et  $0,35\% \pm 0,03$  pour les cônes), (le détail de calcul des rendements est mentionné dans l'Annexe 5) obtenues par Hydrodistillation, étaient absolument supérieurs comparés à ceux rapportés par Macchioni et al., [2003], sur les aiguilles, les branches et les cônes de la même espèce dans la région du Asciano, Italie ( $0,33\%$ ,  $0,26\%$  et  $0,06\%$  respectivement).

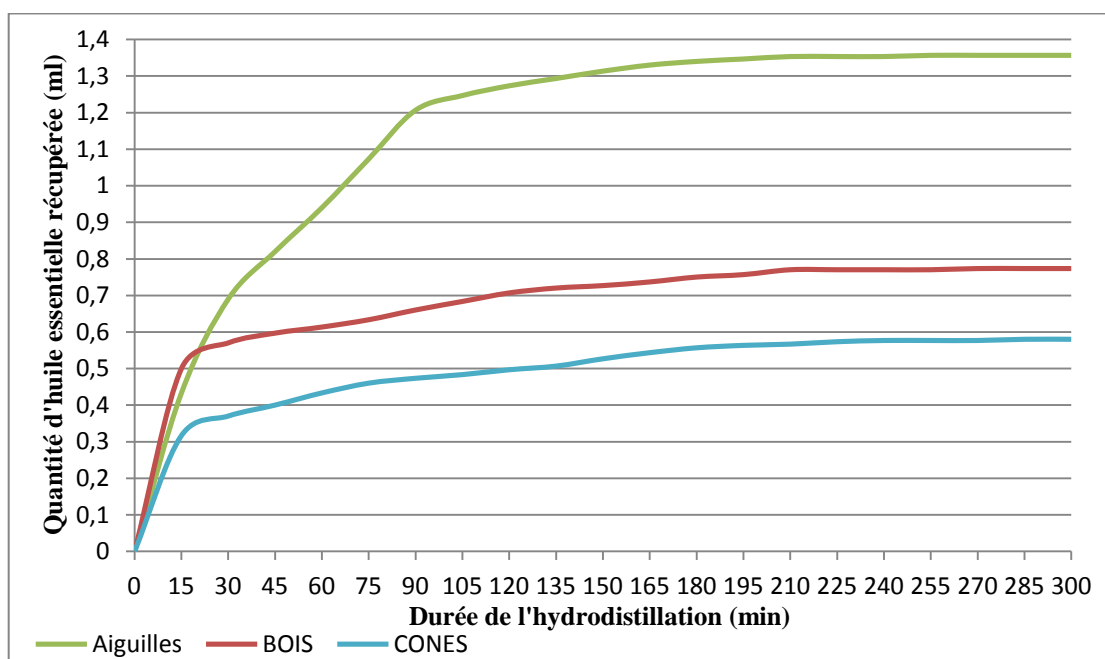
Le rendement des aiguilles est aussi supérieur à celui des aiguilles du pin de la forêt du lac Mellah dans le Parc National d'El Kala (0,81%) [Sadou et *al.*, 2003] et du pin de Sidi Feradj, Alger (0,52%) [Dob et *al.*, 2005] (Tableau II).

**Tableau II** : Rendement en huiles essentielles du Pin d'Alep

Rendement en huiles essentielles de <i>Pinus halepensis</i>	Macchioni et <i>al.</i> , 2003 Asciano Italie	Sadou et <i>al.</i> , 2003 lac Mellah El Kala	Dob et <i>al.</i> , 2005 Sidi Feradj Alger	Notre étude EL-Haourane M'sila
Aiguilles	0,33 %	0,81 %	0,52 %	1,34% ± 0,01
Branches	0,26 %	-	-	0,63% ± 0,007
Cônes	0,06 %	-	-	0,35 % ± 0,03

## 2. Etude de la cinétique d'extraction

Cette étude nous a permis de suivre l'évolution du rendement en huile essentielle en fonction de la durée de l'Hydrodistillation afin d'optimiser la durée d'extraction (Figure 16).



**Figure 16** : Cinétique d'Hydrodistillation en fonction du temps

La cinétique peut se diviser en quatre étapes qui s'expliquent comme suit :

- La première étape (0-18 mn) correspond à une augmentation rapide et progressive de la quantité en huile essentielle ou la majeure partie de l'huile essentielle (0,6 ml pour les aiguilles, 0,56 ml pour les branches et 0,34 ml pour les cônes) est extraite, ce qui

correspond à 44,44 % de la totalité de l'huile essentielle extraite pour les aiguilles, 72,44 % pour les branches et 58,62 % pour les cônes.

- Dans la deuxième étape (18-90), nous observons que la vitesse d'extraction de l'huile essentielle des aiguilles augmente continuellement pour atteindre un rendement de 1,23 ml environ (91,11 %) vers la 90<sup>ème</sup> minute, par contre une nette diminution de la vitesse instantanée d'extraction de l'huile essentielle des branches et des cônes est remarquée dans cette étape.
- Pour la troisième étape (90-210), nous observons une diminution progressive de la vitesse d'extraction des huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes.
- Dans la quatrième étape (plus de 210 min) la quantité de l'huile essentielle extraite a atteint un plateau (1,35 ml pour les aiguilles, 0,77 ml et 0,58 ml pour les branches et les cônes respectivement), Celui-ci correspond au rendement maximum possible à atteindre. Le temps optimum de cette Hydrodistillation est d'environ 4h.

### 3. Étude analytique des huiles essentielles

#### 3.1. Propriétés organoleptiques

L'huile essentielle obtenue par l'Hydrodistillation des aiguilles est de couleur transparente incolore, d'une odeur particulière forte correspondent bien aux aiguilles du *Pinus halepensis*. Celle des branches est de couleur jaunâtre et boisée. L'huile essentielle issue des cônes est transparente légèrement colorée en jaune d'une odeur douce très semblable à celle des graines du pin d'Alep. Toutes les trois présentent un aspect liquide et limpide (Tableau III).

**Tableau III** : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles obtenues

*Pinus halepensis* / EL-Haourane M'sila

	Partie	Aiguilles	Branches	Cônes
<b>Nos Résultats</b>	Aspect	Liquide limpide	Liquide limpide	Liquide limpide
	Odeur	Forte, semblable à celle des aiguilles	Douce, boisée	Douce, semblable à celle des graines
	Couleur	Transparente incolore	Jaunâtre	Légèrement colorée en jaune

### 3.2. Indices physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques tels que : la densité relative, le pouvoir rotatoire, l'indice de réfraction, le pH, l'indice d'acide, l'indice d'ester, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle [Afssaps, 2008]. Le Tableau IV regroupe les résultats des mesures réalisées.

**Tableau IV** : Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles du pin d'Alep

	Macchioni et al., 2003			Ph. EUR., 2012	Notre étude		
	<i>Pinus halepensis</i> / Italie				<i>Pinus halepensis</i> / M'sila		
	Aiguilles	Branches	Cônes		Aiguilles	Branches	Cônes
Densité relative	-	-	-	0,95-0,824	0,896	0,84	0,877
Indice de réfraction 20°C	-	-	-	1,3-1,7	1,48	1,47	1,48
Taux d'humidité KF	-	-	-	< 1%	0,7 %	0,6 %	0,61 %
pH	-	-	-	<5,8	4,98	4,96	5,47
Miscibilité à l'Ethanol	-	-	-	-	8 ml	7 ml	7 ml
Carbonyle C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	0 %	0,2 %	6,1 %	-	5,52 %	2,63 %	2,52 %
Indice de peroxyde	-	-	-	20 – 30	26,17	21,13	27,29
Indice d'acide	-	-	-	< 2	0,66	1,29	0,95
Indice d'ester	-	-	-	-	74,61	5,32	15,98

La détermination de la densité relative peut être considérée comme un critère de pureté qui indique la présence de corps étrangers [Kaloustian et al., 2013], La densité des huiles essentielles est inférieure à celle de l'eau, ce qui est le cas pour les huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes (0.89, 0,84 et 0,87 respectivement) dans notre étude.

Dans l'intervalle 1,300 à 1,700 l'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et les dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé [Koba et al., 2003, Kaloustian et al., 2013]. Ce qui est le cas de l'huile essentielle des aiguilles et des cônes par rapport à celle des branches dans notre étude.

Le taux d'humidité définit la qualité et la pureté des huiles essentielles, il permet de déterminer les traces d'eau dans une huile essentielle. Le taux d'humidité mesuré doit être inférieur à 1 [Ph. EUR., 2012, Kaloustian et al., 2013]. Dans la présente étude nous avons obtenus un taux d'humidité égale à 0,7 % pour l'huile essentielle des aiguilles, 0,6% pour celle des branches et 0,61 % pour l'huile essentielle des cônes, ce qui est légèrement élevé (proche de la limite maximale). Cela peut être expliqué par la méthode choisi pour

l'extraction des huiles essentielles (Hydrodistillation), qui présente l'inconvénient de laisser des traces d'eau lors de la récupération [Benhabiles., 1995].

Les huiles essentielles de bonne qualité ont un pH inférieur à 5,8 et sont par conséquent légèrement acide, [Balz et *al.*, 1990]. Ce qui est le cas pour les huiles essentielles de *Pinus halepensis* dans notre étude, le pH est égal à 4,98 pour l'huile essentielle des aiguilles, 4,96 pour celle des branches et 5,47 pour l'huile des cônes.

Le taux des carbonyles exprimés en  $C_{10}H_{16}O$  varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes oxygénés qui sont généralement des alcools monoterpènes. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé [Bruneton, 1999]. Ce qui est le cas pour l'huile essentielle des aiguilles par rapport à celle des branches et des cônes dans notre étude. Les résultats obtenus sont complètement différentes en comparaison avec ceux de Macchioni et *al.*, [2003]. Cela est dû à plusieurs raisons, comme l'origine géographique différente de l'espèce étudiée, ce qui fait intervenir le phénomène de polymorphisme chimique.

L'indice de peroxyde est lié aux conditions de conservation et aux modes d'extraction. C'est un critère très utile et d'une sensibilité satisfaisante pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative. La PHARMACOPÉE EUROPEENNE [Ph. EUR., 2012] limite l'indice de peroxyde entre 20 et 30 pour une quantité de 0,8 à 1,2 g d'huile essentielle. Dans notre étude l'indice de peroxyde est égal à 26,17 pour l'huile essentielle des aiguilles, 21,13 pour celle des branches et 27,29 pour l'huile essentielle des cônes du pin d'Alep. Cela, indique le bon conditionnement de nos huiles essentielles.

Un indice d'acide inférieur à deux, est une preuve de bonne conservation de l'huile. En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acides libres. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle l'hydrolyse des esters [Kaloustian et *al.*, 2013]. Nous avons obtenus dans notre étude un indice d'acide inférieur à deux pour les trois huiles essentielles étudiées, preuve d'une bonne conservation, même pendant une période très courte (une vingtaine de jours).

D'autre part et pour mieux caractériser la qualité des huiles essentielles de *Pinus halepensis* nous avons mesuré l'indice d'ester qui est égale à 74,61 pour l'huile essentielle des aiguilles, 5,32 pour celle des branches et 15,98 pour l'huile des cônes. Les huiles essentielles de très bonnes qualités renferment une très grande quantité d'esters [Othmer., 2012].

Les paramètres physico-chimiques de notre huile essentielle sont en accord avec la Pharmacopée Européenne [Ph. EUR., 2012].

#### 4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Dans le but de la confirmation des souches étudiées et de vérifier leur pureté des tests biochimiques et culturaux, ont été réalisés. Les résultats obtenus sont mentionnés dans l'Annexe 7. Ces résultats confirment la pureté des souches utilisées.

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux huiles essentielles du pin d'Alep et aux antibiotiques sont regroupés dans le Tableau V. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures.

Pour mieux caractériser l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pinus halepensis*, des comparaisons sont effectuées entre le coefficient d'activité de l'antibiotique pour chaque souche et celui des huiles essentielles. Le tableau VI résume les résultats obtenus.

**Tableau V :** Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne exprimée en mm (moyenne  $\pm$  écart type), transcrite en sensibilité.

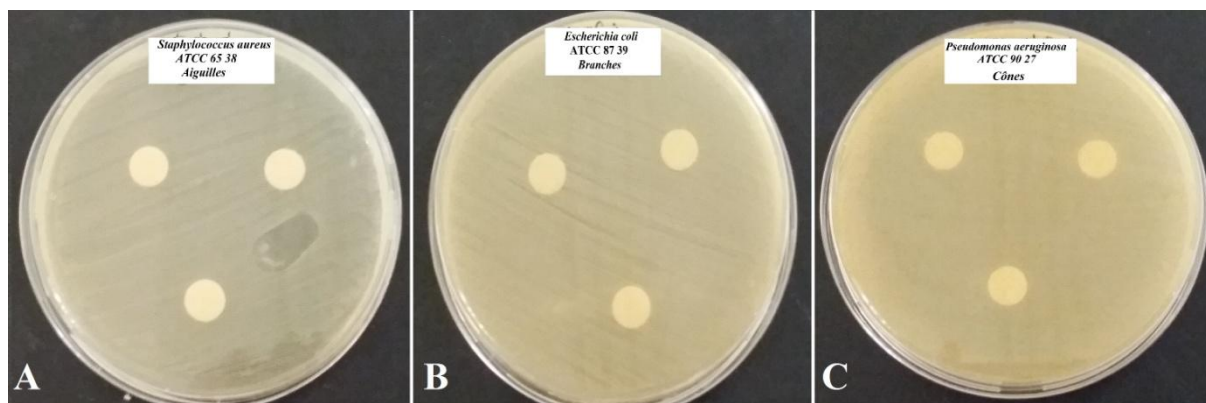
	Souches/ Partie utilisée/Test		Huile Essentielle 10 $\mu$ L			Antibiotique			
			Diamètres d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité	Antibiotique Utilisé	Diamètres d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité
Gram+	<i>S. aureus</i>	Aiguilles	0	0	Résistante	FA 10 $\mu$ g	27,63 $\pm$ 1,13	++	Assez sensible
		Branches	0	0	Résistante				
		Cônes	0	0	Résistante				
	<i>B. subtilis</i>	Aiguilles	28,44 $\pm$ 1,34	++	Assez Sensible	OFX 5 $\mu$ g	30 $\pm$ 0,11	++	Assez sensible
		Branches	18,55 $\pm$ 3,67	+	Sensible				
		Cônes	27,33 $\pm$ 4,91	++	Assez Sensible				
Gram-	<i>P. aeruginosa</i>	Aiguilles	0	0	Résistante	IMP 10 $\mu$ g	28 $\pm$ 0,11	++	Assez sensible
		Branches	0	0	Résistante				
		Cônes	0	0	Résistante				
	<i>E. coli</i>	Aiguilles	0	0	Résistante	FT 300 $\mu$ g	15 $\pm$ 0,03	+	Sensible
		Branches	0	0	Résistante				
		Cônes	0	0	Résistante				
Champignon/ Levure	<i>C. albicans</i>	Aiguilles	0	0	Résistante	Ny 100 $\mu$ g	21,17 $\pm$ 1,44	++	Assez sensible
		Branches	17,33 $\pm$ 1,76	+	Sensible				
		Cônes	14,33 $\pm$ 2,08	+	Sensible				
	<i>A. brasiliensis</i>	Aiguilles	0	0	Résistante	Ny 100 $\mu$ g	15,32 $\pm$ 0,31	++	Assez sensible
		Branches	11,33 $\pm$ 1,15	+	Sensible				
		Cônes	0	0	Résistante				



**Tableau VI :** Comparaison des coefficients de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du pin d'Alep et des antibiotiques utilisés

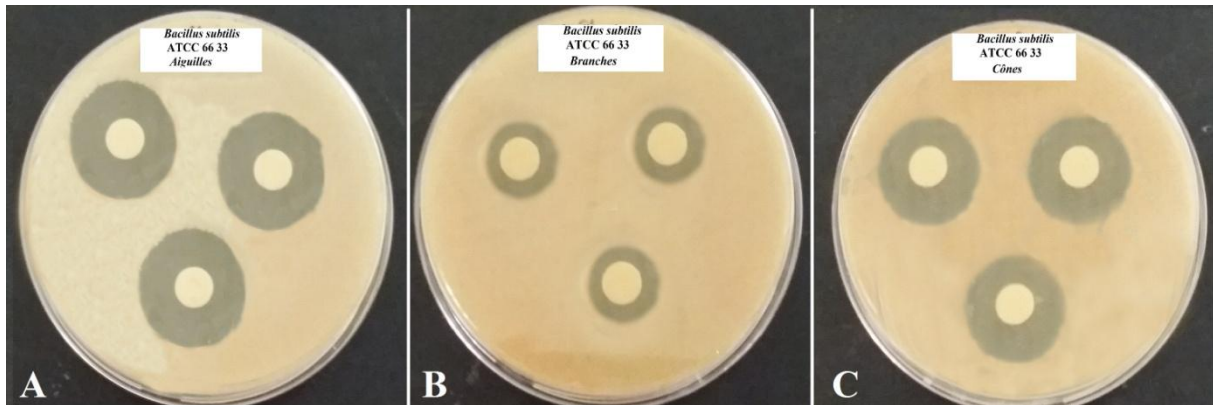
	Souche étudiée	Coefficient de l'activité antimicrobienne			
		Huile essentielle	Coefficient	Antibiotique utilisé	Coefficient
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aiguilles 8,96 µg	0	FA 10 µg	59,95
		Branches 8,4 µg	0		
		Cônes 8,77 µg	0		
	<i>Bacillus subtilis</i>	Aiguilles 8,96 µg	70,92	OFX 5 µg	141,37
		Branches 8,4 µg	32,19		
		Cônes 8,77 µg	66,9		
Gram-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aiguilles 8,96 µg	0	IMP 10 µg	61,57
		Branches 8,4 µg	0		
		Cônes 8,77 µg	0		
	<i>Escherichia coli</i>	Aiguilles 8,96 µg	0	FT 300 µg	0,58
		Branches 8,4 µg	0		
		Cônes 8,77 µg	0		
Champignon/Levures	<i>Candida albicans</i>	Aiguilles 8,96 µg	0	Ny 100 µg	3,51
		Branches 8,4 µg	28,09		
		Cônes 8,77 µg	18,39		
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Aiguilles 8,96 µg	0	Ny 100 µg	1,84
		Branches 8,4 µg	12		
		Cônes 8,77 µg	0		

Les résultats obtenus, montrent que la variation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées est en fonction de la souche cible. Il s'est avéré aussi qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée vis-à-vis d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Figure 17), pour les trois huiles testées. Aussi, l'huile essentielle des aiguilles n'a montré aucun pouvoir inhibiteur sur la croissance de la levure et du champignon et l'huile essentielle des cônes s'est montrée inactive contre la souche d'*Aspergillus brasiliensis*.



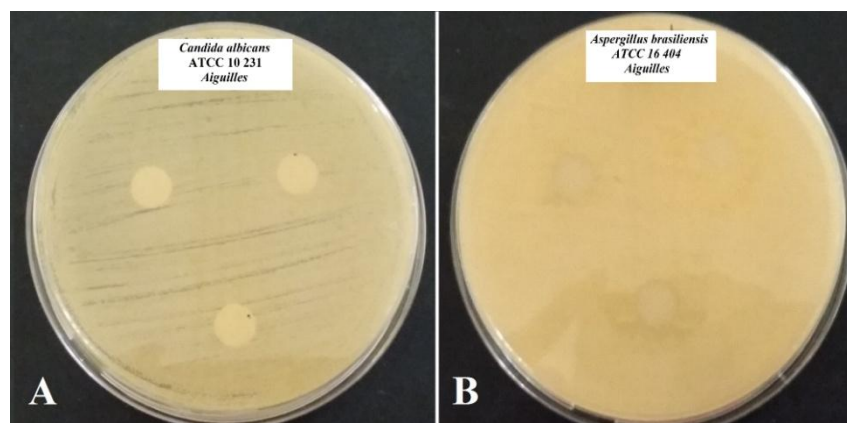
**Figure 17 :** Photos montrant la résistance des souches testées à l'effet antimicrobien des huiles essentielles du pin d'Alep (Original., 2016).

Il est à noter que l'huile essentielle des aiguilles, des branches et des cônes du pin d'Alep, ont exercé une activité inhibitrice contre une seule souche bactérienne qui est *Bacillus subtilis* avec des diamètres d'inhibition de 28,44 mm, 18,55 mm et 27,33 mm respectivement (Figure 18).

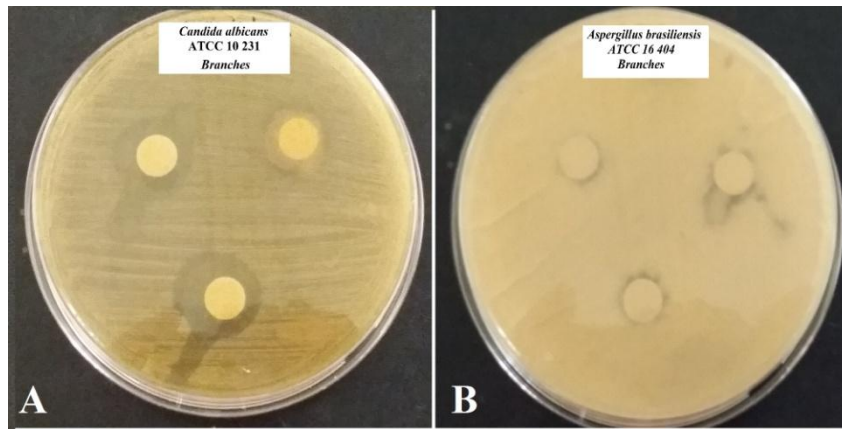


**Figure 18 :** Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle des aiguilles (A), des branches (B) et des cônes (C), sur *Bacillus subtilis* (Original., 2016).

Concernant l'activité des huiles essentielles testées sur la levure et le champignon utilisées, il apparaît que l'huile des aiguilles ne présente aucun pouvoir inhibiteur sur la croissance de *Candida albicans* et l'*Aspergillus brasiliensis* (Figure 19). Contrairement à la première, l'huile essentielle des branches a montré un effet inhibiteur sur la croissance des deux souches avec un diamètre d'inhibition de 17,33 mm et 11,33 mm respectivement (Figure 20). En ce qui concerne l'huile essentielle des cônes du pin d'Alep, cette dernière a exercé une activité inhibitrice contre *Candida albicans* seulement (14,33 mm) et aucun effet n'a été observé envers *Aspergillus brasiliensis*.



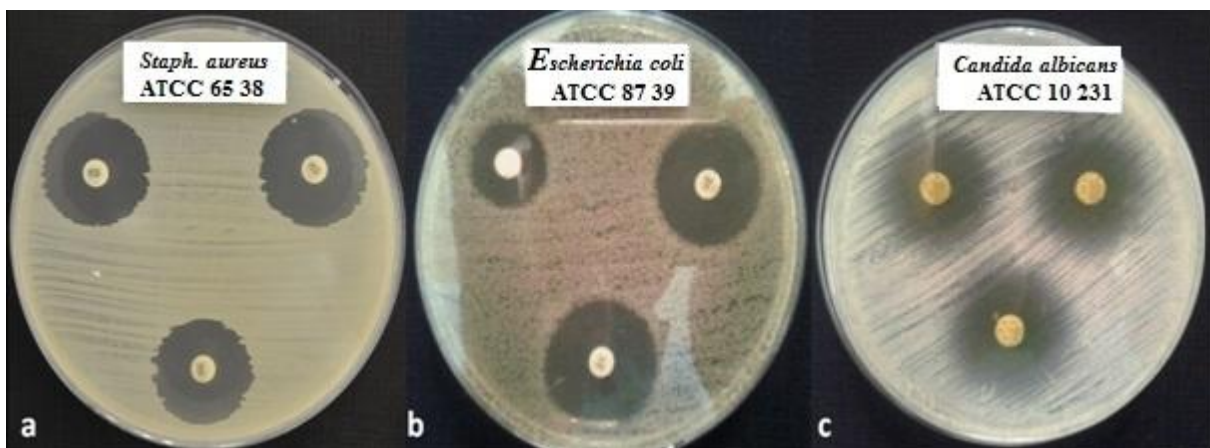
**Figure 19 :** Photos montrant la résistance de *C.albicans* (A), et *A.brasiliensis* (B) à l'effet antimicrobien de l'huile essentielle des aiguilles (Original., 2016).



**Figure 20 :** Photos montrant l'effet antimicrobien de l'huile essentielle des branches sur *C.albicans* (A), et *A.brasiliensis* (B) (Original., 2016).

Pour les témoins positifs (disques d'antibiotique) (Figure 21), le diamètre des zones d'inhibition varie selon les espèces.

Il est à noter que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du pin d'Alep est semblable à celle de l'antibiotique utilisé contre *Bacillus subtilis* qui est l'Ofloxacin (Ofx 5 $\mu$ ). Ces résultats sont très intéressants puisqu'elles témoignent d'une forte activité antimicrobienne.



**Figure 21 :** Photos montrant l'effet antimicrobien des différents antibiotiques sur : *S. aureus*(a), *E. coli*(b), et *C. albicans*(c). (Original., 2016).

Un fait saillant peut être dégagé de ces résultats et qui concerne la levure et le champignon testé. En effet, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* ont manifesté une sensibilité élevée à l'huile essentielle des branches avec un coefficient de 28,09 et 12 respectivement. Celle des cônes a exercé une inhibition avec un coefficient de 18,39. Ces résultats sont largement supérieurs en comparaison au coefficient de l'activité inhibitrice de l'antifongique utilisé pour la levure et le champignon (3,51 et 1,85).

Sachant que plusieurs auteurs ont démontré que *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* se montrent résistantes aux agents biocides [Tangarife-Castaño et al., 2011, Shanmugaprakash et al., 2015].

Les travaux de Ghalem et Mohamed, [2008], ont indiqué que les composés présents dans les plus grandes proportions peuvent ne pas être nécessairement responsables de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Alors que cette activité selon Delaquis et al., (2002) pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à des faibles taux non négligeables connus pour exhiber une activité antimicrobienne impliquée dans les phénomènes de synergie entre les différents constituants qui peuvent être à l'origine d'une activité antimicrobienne beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pinus halepensis* est due principalement à son profil chromatographique. Les alcools terpéniques (Terpinen-4-ol,  $\alpha$ -Terpineol, Epimanol) et les terpènes (Camphène,  $\beta$ -pinène, caryophyllène) sont réputés pour avoir une certaine action bactéricide [Dorman et Deans, 2000 ; Inouye et al., 2001 ; Belletti et al., 2004 ; Abi-Ayad et al., 2011].

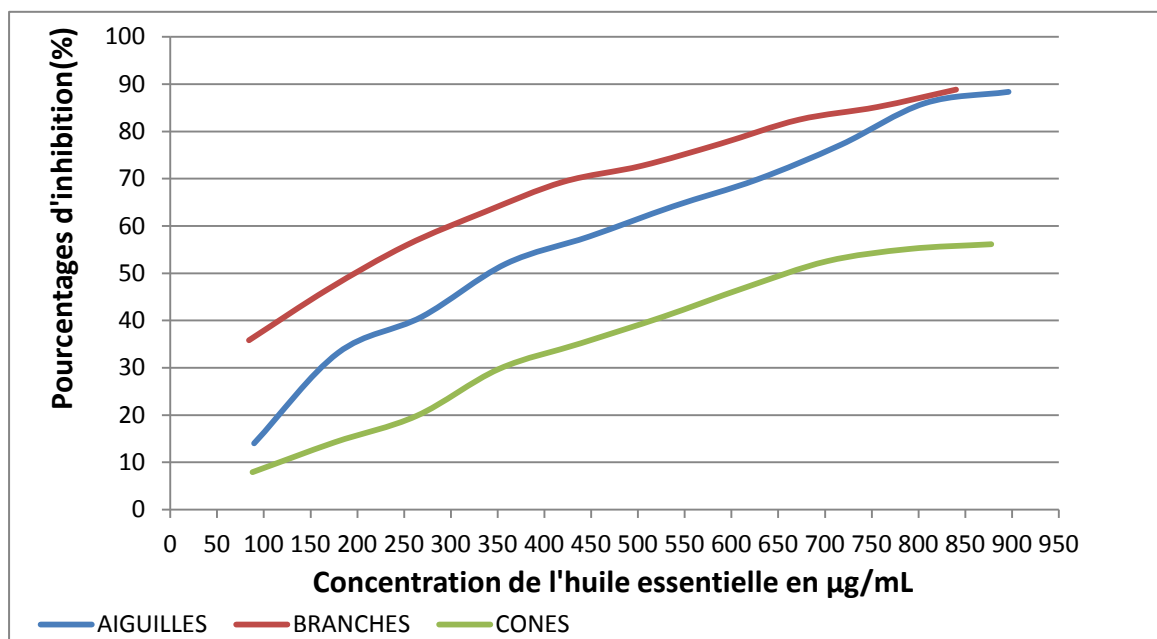
Par ailleurs, nous avons comparé nos résultats avec ceux de Sadou et al., [2003], Abi-Ayad et al., [2011] et Fekih et al., [2014], qui ont étudié le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle des aiguilles et l'huile essentielle de la partie aérienne complète de *Pinus halepensis* sur plusieurs souches, (Tableau VII). Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles du pin d'Alep obtenus dans notre étude vis-à-vis les souches testées est complètement différent de ceux de Sadou et al., [2003], Abi-Ayad et al., [2011] et Fekih et al., [2014], cela est dû à plusieurs raisons, comme l'origine géographique différente de l'espèce étudiée, ce qui fait intervenir le phénomène de polymorphisme chimique.

**Tableau VII :** Comparaison des résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles testées avec les résultats trouvées dans la littérature

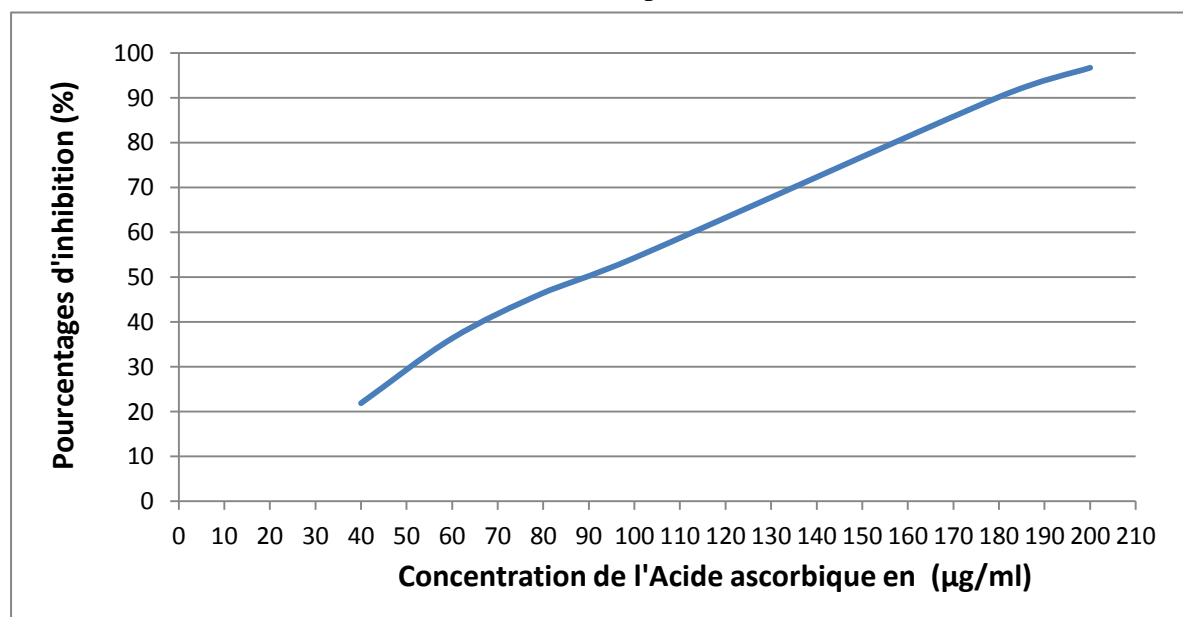
Souches/ Partie utilisée/Test		Diamètres d'inhibition (mm)				
		Notre étude	Sadou et <i>al.</i> , [2003] Aiguilles du pin d'Alep	Abi-Ayad et <i>al.</i> , [2011] Branches	Fekihet <i>al.</i> , [2014] Total de la partie aérienne	
Gram+	<i>S. aureus</i>	Aiguilles	0	12	-	0
		Branches	0	-	-	
		Cônes	0	-	-	
	<i>B. subtilis</i>	Aiguilles	28,44 ± 1,34	-	-	0
		Branches	18,55 ± 3,67	-	-	
		Cônes	27,33 ± 4,91	-	-	
Gram-	<i>P. aeruginosa</i>	Aiguilles	0	13,24	-	8
		Branches	0	-	-	
		Cônes	0	-	-	
	<i>E. coli</i>	Aiguilles	0	0	-	0
		Branches	0	-	-	
		Cônes	0	-	-	
Champignon/ Levure	<i>C. albicans</i>	Aiguilles	0	-	-	-
		Branches	17,33±1,76	-	12	
		Cônes	14,33±2,08	-	-	
	<i>A. brasiliensis</i>	Aiguilles	0	-	-	-
		Branches	11,33 ± 1,15	-	15	
		Cônes	0	-	-	

### 5. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Pinus halepensis* a été faite en comparaison avec celle de l'acide ascorbique. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire (Figure 22 et 23). A partir de ces courbes nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi la valeur d'IC50 de l'acide Ascorbique et de chaque huile essentielle.



**Figure 22 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes Concentrations utilisées pour les huiles essentielles.



**Figure 23 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes Concentrations utilisées pour l'Acide ascorbique.

### 5.1. Pourcentage d'inhibition

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'Acide ascorbique ou pour les huiles essentielles du pin d'Alep. Le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé a été observé pour l'huile essentielle des branches suivi par celle des aiguilles et l'huile des cônes respectivement. On remarque aussi que le pourcentage d'inhibition du radical libre, soit pour l'huile essentielle des aiguilles des branches ou des cônes de *Pinus halepensis*, est inférieur à celui de l'acide ascorbique.

### 5.2. Détermination des IC50

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre à 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

L'huile essentielle des branches, des aiguilles et des cônes de *Pinus halepensis* pouvaient transformer le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (coloré en violet) au diphenylpicrylhydrazine (coloré en jaune) avec des IC50 de 372,66 µg/ml, 187,31 µg/ml et 656,64 µg/ml respectivement, montrant ainsi une activité antioxydante largement inférieure à celle de l'acide ascorbique avec un IC50 de 93,25 µg/ml.

### 5.3. Cinétique de la réaction

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire des huiles essentielles du pin d'Alep, la cinétique de réduction du DPPH est suivie au cours du temps avec une concentration d'antioxydant égale à IC50 jusqu'à l'obtention d'un plateau au temps final. Les résultats obtenus ont permis de tracer les profils cinétiques et de déduire par interpolation graphique le temps TEC50 nécessaire pour atteindre l'équilibre à IC50 (Figure 24).

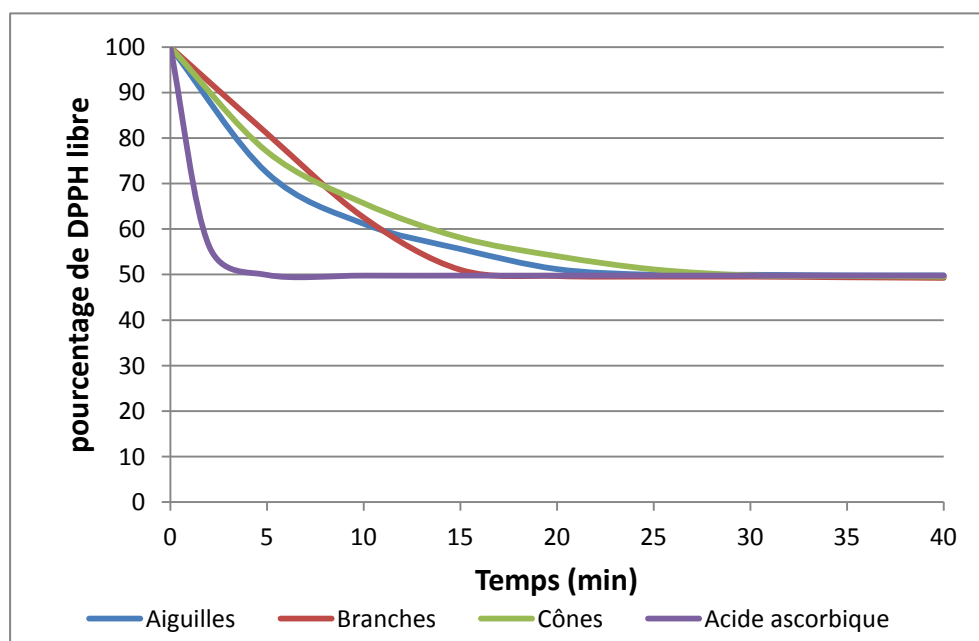


Figure 24 : Cinétique de réduction de DPPH par les huiles essentielles et l'Acide ascorbique

Pour Les huiles essentielles, la réaction est biphasée, avec une baisse rapide dans l'absorbance dans les premières minutes, suivies d'une étape plus lente, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint, alors on distingue deux zones : une zone à forte cinétique de piégeage du radical observée au bout des six premières minutes ; une deuxième zone à faible cinétique de piégeage du radical DPPH ou zone de tendance vers l'équilibre constatée soit pour l'huile essentielle des aiguilles, des branches ou des cônes, après les six premières minutes.

L'acide ascorbique, a montré une baisse rapide dans l'absorbance dès les premières secondes, Pour atteindre l'équilibre avant les trois premières minutes.

Lorsqu'on étudie la réaction entre le DPPH et l'Acide ascorbique donneur d'hydrogène, on constate que la réaction atteint un équilibre au bout d'un temps très court par rapport aux huiles essentielles de *Pinus halepensis*.

#### 5.4. Détermination des TEC50

Nous avons choisi l'état d'équilibre comme période de mesure où il s'avère que la réaction ne progresse pas plus loin. Le temps à l'état d'équilibre dépend de la réactivité des antioxydants.

L'estimation des TEC50 permet d'introduire la classification suivante:  $TEC50 < 5$  min (réaction rapide),  $5 < TEC50 < 30$  min (réaction intermédiaire) et  $TEC50 > 30$  min (réaction lente) [Brand-Williams et *al.*, 1995 ; Scherer et Godoy.,2009].

Le TEC50 pour l'huile essentielle des branches est de 21,97 mn (réaction intermédiaire). Pour celui des aiguilles, il est de 24,76 min (réaction intermédiaire) et en dernier, l'huile essentielle des cônes a un TEC50 égale à 28,02 min (réaction intermédiaire), alors que l'Acide ascorbique a besoin seulement de 2,3 minute (réaction rapide) pour diminuer la concentration du radical libre de 50%.

#### 5.5. Paramètre d'efficacité anti-radicalaire

Un nouveau paramètre a été défini, l'efficacité anti-radicalaire, qui combine les deux paramètres (IC50 et TC50) afin de caractériser facilement le comportement d'une substance en tant qu'antioxydant.

Les paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH pour l'Acide ascorbique et les huiles essentielles du pin d'Alep sont présentés dans le Tableau VIII.



**Tableau VIII** : Paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH

		IC50 (µg/ml)	IC50 (mg AO/ g DPPH <sup>o</sup> )	TEC50 (min)	EA
<b>Acide ascorbique</b>		93,25	$0,95 \times 10^2$	2,3	$4,57 \times 10^{-3}$
<b>Huile essentielle</b> <i>Pinus halepensis</i>	Aiguilles	372,66	$3,82 \times 10^2$	24,76	$0,105 \times 10^{-3}$
	Branches	187,31	$1,92 \times 10^2$	21,97	$0,237 \times 10^{-3}$
	Cônes	656,645	$6,73 \times 10^2$	28,02	$0,053 \times 10^{-3}$

Ces résultats, montrent que l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* possède une activité antioxydante, Avec une EA de  $0,105 \times 10^{-3}$ . Celle des branches a montré le meilleur pouvoir anti-radicalaire (EA =  $0,23 \times 10^{-3}$ ). Alors que l'huile essentielle des cônes possède un pouvoir anti-radicalaire très faible avec une EA de  $0,053 \times 10^{-3}$ . Mais, ces valeurs sont largement inférieures à celle de l'acide ascorbique EA de  $4,57 \times 10^{-3}$ . Tous les détails et les calculs des paramètres caractéristiques de l'activité anti-radicalaire des huiles essentielles sont mentionnées dans l'Annexe 8.

Cette faible activité peut être due à la dominance de l' $\alpha$ - Pinène, le Myrcene, et le  $\beta$ -caryophyllène, dans l'huile des aiguilles, des branches et des cônes du pin d'Alep qui sont connus par leurs faibles effets antioxydants [Tepe et al., 2005].

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres [Svoboda et Hampson., 1999].

Pour les huiles essentielles de *Pinus halepensis*, les monoterpènes hydrocarbonés tels que le le  $\gamma$ -Terpinene, le Terpinolene et le  $\alpha$ -Terpinene sont des composés minoritaires représentés avec des pourcentages faibles. Ces composés sont réputés pour avoir une propriété antioxydante [Lequeu., 1990; Masson., 2007 ; Aydin et al., 2013].

## **CONCLUSION**

## CONCLUSION

Au terme de notre travail, nous avons pu mettre en évidence les effets biologiques des huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes du pin d'Alep (*Pinus halepensis*), permettant ainsi de mieux valoriser ces dernières.

La détermination de la teneur en eau des aiguilles, des branches et des cônes frais, a montré une teneur égale à  $41 \% \pm 0,18$ ,  $41,61 \% \pm 0,96$  et à  $27,43 \% \pm 0,05$  respectivement. Alors que les rendements en huiles essentielles obtenus par Hydrodistillation sont appréciables ( $1,34\% \pm 0,01$  pour les aiguilles,  $0,63\% \pm 0,007$  pour les branches et  $0,35 \% \pm 0,03$  pour les cônes).

Le contrôle physicochimique des huiles essentielles a permis de mettre en évidence la qualité de ces huiles. Elles se distinguent par un pH acide (pH = 4,98 pour l'huile des aiguilles, 4,96 pour celle des branches et 5,47 pour l'huile des cônes) et un taux de carbonyles (monoterpènes oxygénés) élevé ( $5,52 / 2,63 / 2,52$  pour l'huile des aiguilles, des branches et des cônes respectivement) et des indices physico-chimiques comparables à ceux rapportés par la littérature.

Les huiles essentielles du pin d'Alep ont révélé une activité antimicrobienne significative par rapport aux antibiotiques à l'encontre de certaines souches microbiennes testées, à l'exception d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* qui ont manifesté une résistance totale. Aussi l'huile essentielle des branches a témoigné une activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.

Concernant l'activité antioxydante étudiée par la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphényl-2-picryl-hydrasyl (DPPH) et après comparaison des IC50, nous avons remarqué que l'activité antioxydante de l'huile essentielle des branches de *Pinus halepensis* (IC50 = 372,66 mg/ml) est supérieur à celle de l'huile des aiguilles (187,31 µg/ml) et des cônes (656,64 µg/ml). D'autre part, ces valeurs sont largement inférieures à celle de l'acide ascorbique avec un IC50 de 93,25 µg/ml. L'étude du pouvoir antioxydant a confirmé la propriété antioxydante que possèdent les huiles essentielles du pin d'Alep à piéger les radicaux libres, mais avec une efficacité anti radicalaire ( $EA_{\text{Branches}} = 0,105 \times 10^{-3}$ ,  $EA_{\text{Aiguilles}} = 0,23 \times 10^{-3}$  et  $EA_{\text{Cônes}} = 0,053 \times 10^{-3}$ ) beaucoup moins importante que celle de l'Acide ascorbique ( $4,57 \times 10^{-3}$ ).

A la lumière de ces résultats, il en résulte que les huiles essentielles du pin d'Alep ont une activité antimicrobienne et antioxydante complètement en accord avec l'efficacité qui lui est reconnue dans la littérature. Ainsi elles apparaissent dans ce contexte comme une solution naturelle aux inconvénients, que peuvent produire certains allergènes liés aux conservateurs de synthèse, qu'on peut trouver dans la composition des produits utilisés par l'Homme. En effet, les huiles essentielles du pin d'Alep possèdent un double rôle : une activité antimicrobienne et antioxydante présentant ainsi un conservateur naturel.

En somme, plusieurs interrogations, se posent, notamment l'identification des molécules à l'origine de l'activité antimicrobienne et antioxydante.

Comme perspectives, il sera judicieux d'effectuer d'autres études approfondies qui se résument dans les points suivants :

- Une étude chromatographique pour obtenir une vue globale sur la composition chimique des huiles essentielles du pin d'Alep.
- Des travaux sur la toxicité dermique et la  $DL_{50}$  par ingestion et par inhalation.
- Etude de l'effet de la résine du pin d'Alep sur la tuberculose.
- La mise en évidence du pouvoir hémostatique, antalgique et cicatrisant.
- Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Abi-Ayad M., Abi-Ayad F. Z., Lazzouni H. A., Rebiahi S. A., Ziani\_Cherif C. et Bessiere., «Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil», Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(22), 2011, pp. 5433-5436.
2. Afnor, « Recueil de normes : les huiles essentielles, Tome 1, Echantillonnage et méthodes d'analyse », AFNOR, Paris, (2000), 440 p.
3. Afssaps, «Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles», (2008), 17.
4. Anton R., lobstein A., « Plantes aromatiques: Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ». Ed. Tec & Doc. Paris. (2005), 522.
5. Auclair J., Côté I., «Extraction d'huiles essentielles de conifères », Expo-Journal, rapport interne, department des sciences de la nature, Cégep de Saint-Félicien, Saint-Félicien, (2002), 11 p.
6. Aydin E., Türkez H., Taşdemir S., « Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells », Arh Hig Rada Toksikol, (2013), 1;64(3):415-24.
7. Aydin E., Türkez H., Taşdemir S., « Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells », Arh Hig Rada Toksikol, (2013), 1;64(3):415-24.
8. Babelon J. P., « Dictionnaire de Paris », Ed, Larousse, Paris .1964. 591
9. Balz R., Dandrieux B., Lartaud P., « The Healing Power of Essential Oils: Fragrance Secrets for Everyday Use », Ed. Lotus Press, USA, (1999), 203 p.
10. Belaiche P., « Traité de phytothérapie et d'aromathérapie Tome 1: L'Aromatogramme », Ed. Maloine, France. (1979), 204 p.
11. Belhadj S. K., Mahdjoub M. A., Ammar S., Chraief I., Mighri Z., Aouni M., « Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle de *Coridothymus capitatus* (L.) », Thèse de doctorat Université de Monastir, Tunisie, (2006).
12. Belletti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R., Gardini F., « Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae* », Journal Agricultural Food Chemistry, 52 (23), 6932-6938.
13. Benhabiles N.E., « Comparaisons des huiles essentielles de deux espèces Algériennes de romarin : extraction et étude analytique », Thèse magister, ENP, Alger, (1995).
14. Benhabiles N.E., « Comparaisons des huiles essentielles de deux espèces Algériennes de romarin : extraction et étude analytique », Thèse magister, ENP, Alger, (1995).
15. Benjelali B., Tantaoui E.A., Ismaili-Alaoui M., Ayadi A., « Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé, Plantes Médicinales et Phytothérapie », 20, (1986), 155-67.

16. Bentabet N., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. «Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie», *Phytothérapie*, Springer-Verlag France. 2014, 4-8.
17. Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., « Extraction des huiles essentielles, Chimie et technologie, *Information chimie* », (1988). 179-184.
18. Berset C., Cervelier M. E., « Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power », *Science des aliments*, (1996). 219-245.
19. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., « Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity », *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, (1995), 25-30.
20. Bruneton J., « *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* », 2ème Ed. Lavoisier, Paris, (1993), 915.
21. Bruneton J., « *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Technique et documentation* », 2ème Ed. Lavoisier, Paris, (1999), 1120 p.
22. Burt S.A., « Des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et applications dans les aliments-Un examen », *Journal internationale de Microbiologie des Aliments*, 94, (2004), 223-253.
23. Caillet S. et Lacroix M., « Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire », INRS -Institut Armand-Frappier, (RESALA), 2007, P : 1 - 8.
24. CALAMASSI R., FALUSI M. & TOCCI A. Effet de la température et de la stratification sur la germination des semences de *Pinus halepensis* Mill. *Silvae genetica* 33 (4-5), 1984. 133-139.
25. Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Kahla-Nakbi A.B., Rouabhia M., Mahdouani K., Bakhrouf A., « The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae)», a short review , *Phytotherapy Research: PTR.*, (2007 Jun 21), (6):501-6.
26. Chaumont J.P., Leger D., « *Plant Medicinal, Phyto* ». (1989), 23-124.
27. Chémat F., Cravotto G., « *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds* », Ed. Springer, New York, (2013), 238 p.
28. Chevolleau S., « Etude de l'activité antioxydante des plantes: importance de l'alpha tocophérol », Thèse de Doctorat, Faculté des sciences et techniques de Saint Jérôme, Aix-Marseille, (1990), 186 p.
29. Crapiste G. H., Bredvan M. I. V., Caralli A., « Oxidation of sunflower oil during storage », *Journal of American Oil Chemist's Society*, 76, (1999), 1437-1443.

30. Cristiani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., « Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity », Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, (2007), 6300-6308.
31. Das N.P., Pereira T.A., « Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil : structure activity relationships », Journal of American Oil Chemist's Society, 67, (1990), 255-258.
32. Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. ET Mazza G., « Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oil ». International Journal of Food Microbiology, (2002), 74 (1-2), 101-109.
33. Derooin T., « Biologie florale d'une Annonaceae introduite en Côte D'Ivoire : *Cananga odorata* (Lam.) », Hook. F. and Thoms. Bull. Museum National Histoire Naturelle, 10 (4):, (1988), 377-393.
34. Deysson G., « Organisation et classification des plantes vasculaires », Ed. SEDES et CDVI, Tome II, Paris, (1978), 381 p.
35. Djerrad Z., Kadika L., Djouahriba A., « Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions » Industrial Crops and Products, Volume 74, 15 November 2015, Pages 440-449.
36. Dob T., Berramdane T, Chelgoum C., « Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria », C. R. Chimie 8, 2005, 1939–1945.
37. Dorman H. J. D., Deans S. G., « Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils », Journal of Applied Microbiology, 88, (2000), 308-316.
38. Edris A.E., « Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents » A review. Phytother. Res. (2007), 21, 308-323.
39. Fady B., Semerci H., Vendramin G. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Aleppo pine (*Pinus halepensis*) and Brutia pine (*Pinus brutia*). International Plant Genetic Resources Institute, 2003. Rome (Italy).
40. Fekih N., Allali H., Merghache S., Chaïb F., Merghache D., Djabou N., Muselli A., Boufeldja T., Costa J., « Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria » Asian Pacific Journal of Tropical Disease, Volume 4, Issue 2, 2014, Pages 97-103.
41. Festy D., « Les huiles essentielles, ça marche : Tous les bons gestes pour se soigner autrement », Ed. Leduc. S., Paris, (2009), 320 p.



42. FRANCELET A. Stimulation de l'ouverture des cônes de pins. Institut National de Recherches forestières Tunisiennes, Note technique 13, 1970 : 2-3.
43. Franchomme P., Pénoël D., Jolloi R., Mars J., « Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique: matière, énergie, information. L'aromathérapie exactement », Ed. Limoges, Paris, (1990), 446 p.
44. Garnero M.J., « Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles », In Parfums cosmétiques, arômes, 14, (1977), 31-40.
45. Ghalem B. et Mohamed B., « antibacterial activity of leaf oils of *Eucalyptus globules* and *Eucalyptus camaldulensis*. African Journal of Pharmacology, (2008), 2, 211-215.
46. Grosjean N., « L'aromathérapie tout simplement », Ed. Eyrolles, Belgique, (2007), 361.
47. Guenther E., « The essential oils, Vol. II, III, IV, V, VI. D. », Ed. Van Nostrand, New York, USA, (1975), 866 p.
48. Gunstone F.O., Norris F.A., « Lipids in Food-Chemistry, Biochemistry and Technology », Ed. Pergamon Press, Toronto, Canada, 1983,170.
49. Halliwell B., « How to characterize a biological antioxydant ». Free RadicRes Commun, (1999), 9, 1-32.
50. Hamilton P.R., Franklin R.E., Eichhorn S.E., «Biologie végétale», Ed. De Boeck Supérieur, Belgique, 2000. 944.
51. Hernandez-Ochoa L.R., « Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif d'origine végétale », Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse, France, (2005).
52. Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H., « Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact », Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 47, (2001), 565–573.
53. KADIK B. Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill) en Algérie : Ecologie, Dendrométrie, Morphologie. Office des publications universitaires (Alger). 1987, 585.
54. Kaloustian. J., Hadji-Minaglou F., Vanelle. P., « La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée », Ed. Springer Verlag., France, (2013), 226 p.
55. Koba K., Sanda K., Raynaud C., Mandin D., Millet J., Chaumont J.P., « Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* L, *C. nardus* L et *C. schoenanthus* », Journal de Mycologie Médicale, Vol 13, N° 4, (décembre 2003), 175-180.

56. Kuçuk M., Kolaylı S., Karaoglu S., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F., « Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia », Food Chemistry, 100, (2007), 526-534.
57. Lee S.J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K-G., « Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties », Food Chemistry, 91, (2005), 131–137.
58. Lehir A., cohen Y., « Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments », Elsevier Masson, Paris, (2001), 86-110.
59. Lequeu B., « La vitamine A acquisitions recentes », Ed. Medicales Internationales, France, (1990), 104 p.
60. Ali-Delille L., « Les plantes médicinales d'Algérie », 2ème Ed. Berti, Alger, 2010, p. 200-201.
61. Maarouf A., « Dictionnaire de botanique », 2000.54.
62. Macchioni F., Cioni F. Flamini G., Morelli I., Maccioni S., et Ansaldi M., « Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy », Flavour Fragr. J. 2003; 18: 139–143.
63. Mailhebiau P., « La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs », Ed. Jakin, Lausanne, (1994), 635 p.
64. Mann J., « Secondary metabolism », Clarendon Press, Oxford, (1987), 374 p.
65. Masson O., « Biochimie, Bases biochimiques de la diététique », 2ème édition, Lavoisier, Paris, (2007), 330 p.
66. Mc Farland J., « The nephelometer : An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for for calculating the opsonic index and for vaccines », J. Am. Med. Assoc., 49, (1907), 1176-1178.
67. Membres de la Commission Européenne de Pharmacopée, « Pharmacopée européenne », 6ème édition, Strasbourg, (2008).
68. Membres de la Commission Européenne de Pharmacopée, « Pharmacopée européenne », 3ème édition, Strasbourg, (2001), 667 p.
69. Membres de la Commission Européenne de Pharmacopée, « Pharmacopée européenne », 7ème édition, Strasbourg, (2012).
70. Meyer-Warnod B., « Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils », Perf. Flav, (1984). 9, 93–103, April/May.

71. Milpied H., « Progrès en dermato-allergologie », Gerda, Bordeaux, Ed. John Libbey Eurotext, France, (2009), 391 p.
72. NAHAL I. Taxonomie et aire géographique des pins du groupe *halepensis*. CIHEAM-Options Méditerranéennes. N° 1, 1986. 1-9.
73. NAHAL I., « Le Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Étude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole », Ann. Ecole eaux et forêts. Sta. Rech. Exp 1962, 19(4), 208.
74. NICAULT A., RATHGEBER C., TESSIER L. & THOMAS A. Croissance radiale et densité du bois du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en relation avec les facteurs climatiques. Analyse in situ de la mise en place du cerne. Annals of Forest Sciences 58 : 2001, 769-784.
75. Othmer. K., « Kirk-Othmer Chemical Technology of Cosmetics », Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, (2012), 832 p.
76. Ozenda P., « Les végétaux ; organisation et diversité biologique », Ed. Dunod, 2<sup>ème</sup> éd, Paris, 2006, 516 P.
77. Pellecur J., Jacob M., De Simeon B., Dusart G., Attisso M., Barthez M., Gourgas L., Pascal B., Tomei B., « Plant Médicinal Phytothérapie », (1980), 26-17.
78. Pibiri M.C., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles », Thèse Doctorat, Lausanne, Canada, (2006), 177 p.
79. Pibiri M.C., C. Seigniez., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants », CISBAT, Lausanne, LESO, EPFL, 2001.
80. Pokorny J., « Natural antioxidants for food use, Trends in food science and technology », 9, (1991), 223-227.
81. Prévosto B., « Le Pin d'Alep en France », Ed. Quae, Versailles, 2013, 159 p.
82. QUEZEL P. & MÉDAIL F. « Écologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen » Éd. Elsevier SAS. Paris, 2003, 571.
83. QUEZEL P. « Biogéographie et écologie des conifères sur le pourtour méditerranéen. Dans : Actualités d'Ecologie Forestière », Ed. Gauthier Villars, Paris, 1980. 205-256.
84. Quezel P., Santa S., « Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales », Ed. CNRS, Tom 1, Paris, (1963), 576 p.
85. Rameau J.C., Mansion D., Dumé G., Gauberville C., Bardat J., Bruno E., Keller R., « Flore forestière française. Guide écologique illustré, Région méditerranéenne ». Ed. Foret privée française, Tom 3, Paris, (2008), 2426 p.

86. Roux D., Catier O., « Botanique Pharmacognosie Phytothérapie », Ed. Walters Kluwer, 3<sup>ème</sup> ed., France, (2007), 141 p.
87. Roux D., Chamount J.P., Cleur C., Millet J., Morel M., Tallec D., « Conseil en aromathérapie », Ed. Wolters Kluwer, France, (2008), 187 p.
88. Sadou N., Seridi R, Djahoudi A., Hadeff Y., «Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien», Rev. Sci. Technol., 2015, Synthèse 30: 33-39.
89. Sallé J.L., « Les huiles essentielles, Synthèse d'aromathérapie », Ed. Frison-Roche, 2<sup>ème</sup> Edition, Paris, (1991), 220 p.
90. Sanon, A., Garba, M., Auger, J., Huiganrt, J., « Journal of Stored Products Research», (2002), 38-129.
91. Schaffner W., « Les plantes médicinales et leurs propriétés », Ed. Delachaux Niestlé, Lonay, (1993), 216 p.
92. Scherer R., Godoy H.T., « Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method », Food Chemistry, 112, (2009), 654-658.
93. Schwarz K., Ternes W., « Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* », Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung, 195, (1992), 99-103.
94. Seigue A., « La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes », Ed. Maisonneuve et la rose, Paris, 1985, 502 P.
95. SERRE F. a. Les rapports de la croissance et du climat chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). I- Méthodes utilisées. L'activité cambiale et le climat. *Acta Oecologica / Oecologica plantarum* 2 (2) : 1976, 143-171.
96. SERRE F. b. Les rapports de la croissance et du climat chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). II- L'allongement des pousses et des aiguilles et le climat. Discussion générale. *Acta Oecologica / Oecologica plantarum* 2 (3) : 1976, 201-224.
97. Shanmugaprakash M., Vinothkumar V., Ragupathy J., Amala Reddy D., «Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from *Aspergillus brasiliensis* MTCC 1344»
98. Sivropoulou A., Papanikoalaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., Agric J., Food Chemistry, (1996), 1202 p.
99. Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simonic M., Knez Z., « Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities », Food Chemistry, 89, (2005), 191-198.

100. Svoboda. K.P., Hampson J.B., « Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti inflammatory and other related pharmacological activities», Ed. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, U.K., KA6 5HW, (1999).
101. Tangarife-Castaño V., Correa-Royero J., Zapata-Londoño B, Durán C, Stanshenko E, Mesa-Arango A C., «Anti-Candida albicans activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants», Infectio, Volume 15, Issue 3, September 2011, Pages 160-167.
102. Tepe B., Sokmen M., Akpulat A., Sokmen A., « In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five Allium species from Turkey », Food chemistry, 92, (2005), 89-92.
103. Tepe B., Sokmen M., Akpulat A., Sokmen A., « Screening of the antioxidant potential of six Salvia species from Turkey », Food Chemistry, 95, (2006), 200-204.
104. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Daferara D., Polissiou M., Sokmen A., « Antioxidative activity of the essential oils of Thymus sipyleus subsp. sipyleus var. sipyleus and Thymus sipyleus subsp. Sipyleus var. rosulans », J. Food. Eng. 66, (2005), 447 – 454.
105. Thormar H., « Lipids and Essential Oils as Antimicrobial agents», Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, (2010), 336 p.
106. Tomaino A., Cimino F., Zimbalatti V., Venuti V., Sulfaro V., De Pasquale A., Saija A., « Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils », Food Chemistry, 89, (2005), 549–554.
107. Vardar-Unlu G., Candan F., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen M., Donmez E., Tepe B., « Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of Thymus pectinatus Fisch. et Mey.Var. pectinatus (Lamiaceae) », Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, (2003), 63–67.
108. Wiktionnaire @ Mobile, 2016, Application Androïde
109. Wison R., « Aromatherapy. Essential oils for Vibrant Health and Beauty», Ed. Roberta Wilson, New York, (2002), 340 p.
110. Yaniv Z., Dudai N. « Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East » Ed. Springer. Paris, 2014, 337.
111. Zerrad W., Hillali S., Mataoui B.S., EL Antri S., Hmyene A., « Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur », Congrès International de Biochimie, Agadir, (2006), 371-376.

112. Zhiri A., « Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré », Nutra News, Science, Nutrition, Prévention et santé, Ed. la Fondation pour le libre choix, (2006), 12,8.
113. Chamount J.P., Leger D., « Plant Medicinal, Phyto ». (1989), 23-124.

# **ANNEXES**

# ANNEXE 1

---

## *Appareillage, verrerie et consommables*

### ▪ **Appareillage**

- Autoclave
- Bain marie
- Balance de précision
- Balance de paillasse
- Bec bunsen
- Chauffe ballon 1 L
- Cryostat
- Etuve isotherme
- Hotte à flux laminaire avec lampe UV
- Hydrodistillateur type Clevenger
- incubateur bactériologique (25°C, 35°C, 42°C)
- Microscope photonique avec caméra
- Micro-vortex (Grenier-Charvet – France)
- pH-mètre
- Pied à coulisse
- Plaque chauffante
- Polarimètre Perkin Elmer
- Réfractomètre aus JENA
- Spectrophotomètre
- Support élévateur à croisillons
- Thermostat
- Titracteur Karl Fisher
- Vortex



▪ **Verrerie et consommable**

- Anse de platine
- Ballons à fond plat à col rodé
- Bêchers : 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Burettes
- Compte-gouttes
- Disques d'antibiotiques et antifongiques
- Disques d'aromatogramme en cellulose stériles 9 mm (Schleicher & Schuell Ref ; 321260)
- Disques oxydase
- Écouvillons Stériles
- Eprouvettes
- Erlenmeyer 100 ml, 250 ml
- Fioles
- Flacons avec bouchon
- Galeries biochimiques (Staph A, 20 E, 20 S)
- Lames en verre et lamelles
- Pincés
- Pipettes graduées stériles
- Pipettes Pasteurs
- Réfrigérants à reflux
- Seringues
- Spatule inox
- Tubes à essai
- Verres de montre

▪ **Solutions et réactifs**

- 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
- Acide acétique
- Acide ascorbique
- Acide chlorhydrique
- Acide chlorhydrique (HCl) : 0,5 mol/l
- Amidon
- Bleu de bromophénole
- Chlorhydrate d'hydroxylamine
- Chloroforme
- Eau distillée
- Eau physiologique
- Eau pour préparation injectable (EPI)
- Ethanol 95°, 96°, et 100°
- Fuchsine
- Hydroxyde de potassium (KOH) : 0,02 mol/l et 0,5 mol/l
- Hydroxyde de potassium alcoolique 0,5 mol/l
- Iodure de potassium
- Lugol
- Méthanol
- Phényle - diméthyle polysiloxane
- Plasma oxalaté de lapin
- Polysorbate 80
- Rouge de phénol
- Thiosulfate de sodium 0,01 mol/l
- Violet de gentiane

## ANNEXE 2

---

### *Milieux de culture*

- Gélose Trypto-Caséine-Soja précoulée
- Gélose Sabouraud + Chloramphénicol précoulée
- Eau peptonée tamponnée, flacon de 100 ml
- Bouillon d'enrichissement Entérobactéries selon Mossel
- Milieu VRBL glucosé précoulé
- Bouillon Trypto-Caséine-Soja, flacon de 100 ml
- Milieu gélosé Cétrimide (coulé en boîte de Pétri)
- Milieu gélosé Chapman (coulé en boîte de Pétri)
- Bouillon Trypto-Caséine-Soja, tube de 10 ml
- Eau physiologique
- Gélose de conservation
- Gélose Mossel
- Gélose Slanetz et Bratley
- Gélose de MacConkey
- Gélose de Czapek

## ANNEXE 3

---

### *Calcul expérimentale des facteurs de correction des solutions titrantes*

#### ❖ **Facteur de réactif KF**

La solution titrante du Karl Fischer est constituée de Pyridine, Iode, Méthanol et de Sulfate, la détermination du titre de cette solution (Facteur) a été réalisée en utilisant une solution standard de tartrate di-sodique di-hydraté avec une teneur en eau de  $10 \pm 0,1$  mg/g.

L'appareil détermine à la fin du titrage le volume du réactif de KF utilisé en millilitres [NF ISO 11021].

Le titre est calculé selon la formule suivante :

$$f_{KF} = \frac{v}{m_{Ech}} \times Hu_{tds} \times 100$$

$f_{KF}$  : facteur de réactif KF

$Hu_{tds}$  : taux d'humidité de tartrate

$V$  : volume en millilitres du réactif de KF utilisé

$m_{Ech}$  : masse en milligramme de l'échantillon

#### ❖ **Facteur de solution d'hydroxyde de potassium alcoolique $f_{KOHAlc}$**

1000 mg de phtalate potassique a été dissoute dans 50 ml d'eau, à la quelle 0,5ml de solution de phénolphaléine est ajouté, nous avons titré par la solution testée ( $KOH_{Alc}$  0,5 M) jusqu'au début du virage de l'indicateur au rose.

Le titre (facteur) est calculé à l'aide de la formule suivante [Ph. Eur6., 2008]:

$$f_{KOH\ Alco} = \frac{P_{ph}}{v \times M_{ph} \times M_{KOH}}$$

$P_{ph}$  : la masse de phtalate potassique

$v$  : volume (ml) de KOH alcoolique utilisé pour le titrage

$M_{ph}$  : masse molaire de phtalate potassique

$M_{KOH}$  : molarité de la solution testée

#### ❖ **Facteur de solution de thiosulfate $f_{thiosul}$**

10,0 ml de bromate de potassium 0,033 M a été ajoutée à 40ml d'eau, nous avons ajouté 10 ml de solution d'iodure de potassium et 5 ml d'acide chlorhydrique. Puis nous avons titrez par la solution de thiosulfate de sodium à tester en présence de 1 ml de solution d'amidon ajouté en fin de titrage.

Le titre (facteur) est calculé à l'aide de la formule suivante [Ph. Eur6., 2008]:

$$f_{thiosul} = \frac{\frac{v_{thiosulf}}{C_{KBr} \times v_{KBr}}}{0,01}$$

$V_{thiosul}$  : volume (ml) de thiosulfate de sodium utilisé pour le titrage

$v$  : volume (ml) de KOH alcoolique utilisé pour le titrage

$C_{KBr}$  : molarité de la solution de bromate de potassium (0,033)

$V_{KBr}$  : volume (ml) de bromate de potassium 0,033 M utilisé pour le test (10 ml)

#### ❖ Facteur de solution d'hydroxyde de potassium $f_{KOH}$

1000 mg de phtalate potassique à été dissoute dans 50 ml d'eau, à la quelle 0,5ml de solution de phénolphtaléine est ajouté, nous avons titré par la solution testée (KOH 0,02 M) jusqu'au début du virage de l'indicateur au rose.

Le titre (facteur) est calculé à l'aide de la formule suivante [Ph. Eur6., 2008]:

$$f_{KOH\ Alco} = \frac{P_{ph}}{v \times M_{ph} \times M_{KOH}}$$

$P_{ph}$  : la masse de phtalate potassique

$v$  : volume (ml) de KOH alcoolique utilisé pour le titrage

$M_{ph}$  : masse molaire de phtalate potassique

$M_{KOH}$  : molarité de la solution testée

#### ❖ Facteur de solution d'acide chlorhydrique $f_{Hcl}$

1000 mg de Carbonate de sodium à été dissoute dans 50 ml d'eau, à la quelle 0,1 ml de solution de méthyle orange est ajouté, nous avons titré par la solution testée (HCL 0,5 M) jusqu'au début du virage au rouge-jaune. Chauffé à ébullition pendant 2 min. La solution devient jaune. Laissez à refroidir et titré jusqu'à coloration rouge-jaune.

Le titre (facteur) est calculé à l'aide de la formule suivante [Ph. Eur6., 2008] :

$$f_{Hcl} = \frac{P_{carbonate}}{v \times M_{carb} \times N_{Hcl} \times P_{eq}}$$

$P_{Carbonate}$  : la masse de carbonate de sodium

$v$  : volume (ml) de Hcl utilisé pour le titrage

$M_{Carb}$  : masse molaire de carbonate

$N_{Hcl}$  : normalité de la solution testée

$P_{eq}$  : le poids équivalent

# ANNEXE 4

---

## *Testes de confirmation des souches*

### ❖ **Caractéristiques cellulaires et tests culturaux**

Après ensemencement en quadrant des souches sur leurs milieux sélectifs, et incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour la levure et le champignon ; Les caractères morphologiques des bactéries sont recherchés par la coloration de Gram et l'examen microscopique au grossissement 1000x. Ils permettent l'observation du mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes, et le type de Gram. Pour la levure et le champignon, les caractères morphologiques sont recherchés par l'observation entre lame et lamelle à l'état frais [Denis et *al.*, 20011].

#### ▪ **Coloration de Gram**

- Préparer un frottis de la souche test
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1 min, rincer à l'eau distillée
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée
- Recolorer avec la fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen
- Observation au microscope optique à l'objectif x 100 à l'immersion.

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif [Delarras., 2007].

#### ▪ **Observations à l'état frais entre lame et lamelle**

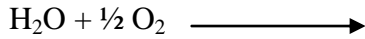
A partir de colonies sur milieu solide

- Prélever une colonie avec une anse et la déposer dans un tube contenant 10 ml d'eau.
- Passer le tube au vortex ou, à défaut, agiter violemment jusqu'à ce que la colonie soit dissociée.
- Prélever une goutte de la suspension et la déposer sur une lame.
- Poser une lamelle en biais le long de la goutte et recouvrir doucement l'échantillon de façon à ne pas emprisonner de bulles d'air.
- Observation au microscope optique à l'objectif x 100 [Meyer et *al.*, 2004].

## ❖ Tests biochimiques

### ▪ Test de la catalase

Le test permet de différencier les bactéries qu'ils ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> une libération d'oxygène gazeux selon la réaction [Denis et *al.*, 2011]:



### ▪ Test de l'oxydase

Ce test permet de distinguer les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète dotées d'un cytochrome oxydase. L'enzyme oxydase ou phényl diamine oxydase intervient dans la phosphorylation oxydative. La mise en évidence de cette oxydase est effectuée à l'aide d'un disque imprégné d'une solution aqueuse à 1 % de chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme. Les colonies sont déposées à l'aide d'une pipette Pasteur [Denis et *al.*, 2011]:

### ▪ Test de la coagulase

Le test est réalisé pour différencier les cocci à Gram positif et catalase positive. L'espèce *Staphylococcus aureus* possède une coagulase libre, l'enzyme capable de coaguler le plasma oxalaté de lapin en 24 h ; des autres espèces et sous espèces de staphylocoques d'origine humaine qui ne possèdent pas de coagulase libre.

La coagulation du plasma de lapin oxalaté par une coagulase s'effectue à partir d'un bouillon enrichi comme le bouillon staphylo-coagulase. Un bouillon de 18h incubé à 37°C est mis en contact, volume à volume, avec du plasma de lapin oxalaté pendant au moins 30 min à 37°C. Si la bactérie possède une coagulase, il y a coagulation du plasma de lapin [Denis et *al.*, 2011].

### ▪ Galleries biochimiques

Il s'agit du système API<sup>®</sup> de bio Mérieux. Ces des cartes plastiques renfermant des tests miniaturisés en microcupules, chaque cupule contenant un substrat spécifique déshydraté. Ces tests d'identification sont basés soit sur l'étude d'une dizaine, d'une vingtaine ou de trente-deux caractères en fonction des espèces à identifier. Ces tests sont basés soit sur une croissance bactérienne associée à une étude de métabolisme, soit à une recherche d'activité enzymatique ne nécessitant pas de multiplication bactérienne [Denis et *al.*, 2011]:

Après l'ensemencement de la galerie par l'inoculum de 0,5 Mc Farland et l'incubation de 18-24 heures (éventuellement prolongées à 48h), la lecture est uniquement colorimétrique en ajoutant les réactifs de la lecture. Les résultats Notées sur la fiche de résultats et l'identification est réalisée à partir de la base de données à l'aide du logiciel d'identification (apiweb<sup>™</sup>).

### ❖ Conservation des souches

A partir des souches identifiées, nous avons fait des repiquages dans des tubes de gélose de conservation en piqûre centrale puis une incubation à 37°C pendant 24h. Les tubes ont été ensuite conservés dans le réfrigérateur à  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  [Denis et *al.*, 2011].

## ANNEXE 5

### *Détermination de la teneur en eau*

Partie	Echantillon	Poids (g)/1J	Poids (g)/2J	Poids (g)/3J	Poids (g)/4J	Poids (g)/5J
Aiguilles	ECH 1	4	2,379	2,377	2,371	2,351
	ECH 2	4	2,391	2,388	2,383	2,363
	ECH 3	4	2,392	2,389	2,384	2,365
Branches	ECH 1	4	2,39	2,38	2,368	2,366
	ECH 2	4	2,371	2,36	2,357	2,348
	ECH 3	4	2,318	2,306	2,296	2,292
Cônes	ECH 1	4	2,936	2,933	2,913	2,9
	ECH 2	4	2,984	2,98	3,933	2,904
	ECH 3	4	2,93	2,942	3,281	2,904

### *Détermination du rendement en huile essentielle*

	Aiguilles			Branches			Cônes		
	ECH 1	ECH 2	ECH 3	ECH 1	ECH 2	ECH 3	ECH 1	ECH 2	ECH 3
Poids de la matière fraîche en g	150			200			200		
Masse de l'huile essentielle en g	1,357	1,341	1,333	0,641	0,627	0,6359	0,334	0,399	0,332
Rendement %	1,357	1,341	1,333	0,641	0,627	0,6359	0,334	0,399	0,332
Rendement moyen %	1,344			0,635			0,355		



## ANNEXE 6

			Sadou et <i>al.</i> , 2003	Dob et <i>al.</i> , 2005	Macchioni et <i>al.</i> , 2003		
			<i>Pinus halepensis</i>	<i>Pinus halepensis</i>	<i>Pinus halepensis</i>		
			lac Mellah	Sidi Feradj	Asciano		
			El Kala	Alger	Italie		
N°	Composés	Classe chimique	Aiguilles	Aiguilles	Aiguilles	Branches	Cônes
1	Tricyclene	Monoterpène	-	tr	-	0,1	<b>0,5</b>
2	$\alpha$ -Thujene	Monoterpène	tr	-	0,1		
3	$\alpha$ -Pinène	Monoterpène	<b>24,41</b>	<b>1,23</b>	<b>18,1</b>	<b>27,9</b>	<b>53,6</b>
4	Camphene	Monoterpène	-	tr	0,3	0,3	<b>1,5</b>
5	Thuja-2.4( 10) –diene	Monoterpène	-	-	-	-	<b>1,3</b>
6	Sabinène	Monoterpène	<b>3,42</b>	<b>1,23</b>	<b>9,4</b>	0,1	
7	$\beta$ -Pinne	Monoterpène	<b>2,13</b>	0,23	<b>2</b>	<b>0,7</b>	<b>1,9</b>
8	$\beta$ -myrcène	Monoterpène	<b>19,38</b>	-	-	-	-
9	Myrcene	Monoterpène	-	<b>3,07</b>	<b>27,9</b>	<b>42,1</b>	<b>13,7</b>
10	3-Carene	Monoterpène	<b>1,33</b>	-	<b>1,7</b>	<b>2,1</b>	<b>1,1</b>
11	$\alpha$ -Terpinene	Monoterpène	tr	0,11	<b>0,5</b>	0,1	
12	$\rho$ -Cymene	Monoterpène	0,4	-		0,1	<b>0,5</b>
13	Limonene	Monoterpène	<b>1,35</b>	tr	<b>1,1</b>	0,4	<b>0,7</b>
14	$\alpha$ -Phellandrene	Monoterpène	0,66	tr	-	-	-
15	$\beta$ -Phallandrene	Monoterpène	-	-	<b>1</b>	0,4	0,3
16	Hexyle acetate	Monoterpène	-	<b>0,7</b>	-	-	-
17	$\beta$ -Ocimene	Monoterpène	-	0,21	-	-	-
18	(E)-Ocimene	Monoterpène	<b>1,13</b>	-	0,4	-	-
19	$\delta$ -3-Carene	Monoterpène	-	0,15	-	-	-
20	$\Upsilon$ -Terpinene	Monoterpène	<b>6,69</b>	tr	<b>0,8</b>	0,1	-
21	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	Monoterpène	-	-	0,1	-	-
22	Terpinolene	Monoterpène	-	-	<b>9,9</b>	0,4	0,4
23	$\alpha$ -Terpinolene	Monoterpène	<b>5,27</b>	0,13	-	-	-
24	Perillene	Monoterpène	-	-	-	-	0,3
25	$\alpha$ -Pinene oxide	Monoterpène	-	0,06	-	-	-
26	Linalool	Monoterpinole	-	tr	0,3	-	-
27	$\alpha$ -Campholenal	Monoterpinole	-	-	-	-	<b>1</b>
28	<i>trans</i> -Pinocarveol	Monoterpinole	-	-	-	0,1	<b>1,5</b>
29	<i>cis</i> -Verbenol	Monoterpinole	-	-	-	-	<b>1,2</b>
30	Camphor	Monoterpène	-	tr	-	0,1	0,4
31	<i>trans</i> -Pinocamphone	Monoterpène	-	-	-	-	0,3
32	Pinocarvone	Monoterpène	-	-	-	-	<b>0,7</b>
33	Umbellulone	Cétone- Monoterpène	-	-	0,1	-	
34	$\rho$ -Menth-1,5-dien-8-ol	Monoterpinole	-	-	-	-	<b>1,2</b>
35	Borneol	Monoterpinole	-	0,13	-	0,2	
36	Terpinen-4-ol	Monoterpinole	0,56	tr	<b>1,1</b>	0,1	0,2
37	$\rho$ -Cymen-8-ol	Monoterpinole	-	tr	-	-	-
38	$\alpha$ -Terpineol	Monoterpinole	-	0,07	0,2	0,2	-
39	$\alpha$ -Terpinyl acetate	Monoterpène	-	tr	-	-	-
40	Myrtenal	Monoterpène	-	-	-	-	<b>1,2</b>
41	Verbenone	Monoterpène	-	-	-	-	<b>0,8</b>
42	<i>trans</i> -Carveol	Monoterpinole	-	-	-	-	0,2
43	Isobornyl acetate	Monoterpène	-	-	-	-	<b>0,9</b>
44	Geranyl acetate	Monoterpène	-	-	0,3	-	-
45	Citronellyl acetate	Monoterpène	-	0,19	-	-	-

46	$\alpha$ -Cubebene	Sesquiterpène	0,46	0,17	0,1	-	-
47	Cyclosativene	Sesquiterpène	-	-	-	<b>0,5</b>	-
48	$\alpha$ -Copaene	Sesquiterpène	-	-	0,4	<b>1</b>	0,3
49	$\beta$ -Bourbonene	Sesquiterpène	-	-	-	-	-
50	$\beta$ -Cubebene	Sesquiterpène	-	-	-	-	-
51	Sativene	Sesquiterpène	-	-	-	-	-
52	$\alpha$ -Yalangene	Sesquiterpène	-	<b>0,64</b>	-	-	-
53	$\beta$ -caryophyllène	Sesquiterpène	<b>31,89</b>	-	<b>16,4</b>	<b>14,3</b>	<b>6,7</b>
54	$\alpha$ -caryophyllène	Sesquiterpène	<b>4,76</b>	-	-	-	-
55	(z)-B -Caryophyllene	Sesquiterpène	-	<b>40,31</b>	-	-	-
56	(E)-B-Farnesene	Sesquiterpène	-	-	0,2	-	-
57	9- <i>epi</i> Caryophyllene	Sesquiterpène	-	-	0,1	-	-
58	$\gamma$ -Muuroolene	Sesquiterpène	-	-	-	0,2	-
59	Germacrene D	Sesquiterpène	-	<b>0,49</b>	0,1	<b>1</b>	-
60	Phenylethyl-3-ntethyl Butanoate	Sesquiterpène	-	-	<b>1,2</b>	-	-
61	Phényl-éthyl-isovalerate	Sesquiterpène	<b>1,61</b>	-	-	-	-
62	<i>epi</i> -Cubebol	Sesquiterpène	-	-	0,2	-	-
63	$\alpha$ -Muuroolene	Sesquiterpène	-	-	0,4	<b>2,7</b>	0,4
64	$\alpha$ -Guaiene	Sesquiterpène	-	0,1	-	-	-
65	Aromadendrelie	Sesquiterpène	-	<b>7,1</b>	-	-	-
66	$\alpha$ -Humulene	Sesquiterpène	-	<b>7,92</b>	<b>2,9</b>	<b>2,4</b>	<b>1,1</b>
67	<i>allo</i> -Aromadendrene	Sesquiterpène	-	<b>0,65</b>	-	-	-
68	$\gamma$ -Muuroolene	Sesquiterpène	-	0,06	-	-	-
69	Bicyclogermacrene	Sesquiterpène	-	tr	-	-	-
70	$\beta$ -Bisabolene	Sesquiterpène	-	tr	-	-	-
71	<i>trans</i> -g-Cadinene	Sesquiterpène	-	-	0,3	-	0,2
72	$\delta$ -Cadinene	Sesquiterpène	-	0,13	0,3	<b>0,5</b>	0,3
73	Caryophyllene oxide	Sesquiterpène	-	-	0,1	0,4	<b>2,3</b>
74	$\beta$ -Sesquiphellandrene	Sesquiterpène	-	<b>0,53</b>	-	-	-
75	Z-Nerolidol	Sesquiterpénol	-	0,07	-	-	-
76	Elemol	Sesquiterpénol	-	<b>0,68</b>	-	-	-
77	$\delta$ -Cadinol	Sesquiterpénol	-	0,23	-	-	-
78	Guaiol	Sesquiterpénol	-	-	0,3	-	-
79	Humulene oxide II	Sesquiterpénol	-	-	-	-	0,3
80	$\alpha$ -Eudesmol	Sesquiterpénol	-	-	0,1	-	0,2
81	$\gamma$ -Eudesmol	Sesquiterpénol	-	0,08	-	-	-
82	Neocembrene	Diterpene	-	-	0,1	-	-
83	Sandaracopimaradiene	Diterpene	-	-	-	-	0,3
84	Abietadiene	Diterpene	-	-	-	0,1	0,2
85	Manoyl oxide	Diterpene	-	tr	-	-	-
Nombre total de composés identifiés			16	89	35	28	35
Aire de présence totale			98,2	66,67	98,5	98,6	97,7
<b>Monoterpènes</b>			66,73	7,51	75,3	75,5	85,4
<b>Sesquiterpènes</b>			38,72	59,16	23,1	23	11,8
<b>Diterpenes</b>			-	-	0,1	0,1	0,5

## ANNEXE 7

### *Résultats de confirmation des souches microbiennes*

Souches/Test	Milieu sélectif	Aspect des colonies	Coloration de Gram	Forme	Catalase	Oxydase	Couagulase	API System
<i>S. aureus</i> ATCC 65 38	<i>Chapman</i>	Lisses, rondes, bombé, pigmentées en jaune orangé	+	Cocci grappes De raisin	+	-	+	Galerie STAPH +
<i>B. subtilis</i> ATCC 66 33	<i>Trypticase- Soja</i>	Grandes, la marge et ondulée, avec forme circulaire et l'élévation plat	+	Bâtonnets droits à bout arrondis	+	NR	NR	NR
<i>E. coli</i> ATCC 87 39	<i>Mac Conkey</i>	Rouges, de taille moyenne avec une marge régulière	-	Bacilles après 24h cocci	-	-	NR	Galerie 20 E +
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 90 27	<i>Cetrimid Base</i>	Plates a bord irrégulier, un pigment vert brillant	-	Bacille fins non capsulés	-	+	NR	Galerie 20 E +
<i>C. albicans</i> ATCC 10 231	<i>Sabouraud + Actidione</i>	Blanches Crémeuses	NR	Rondes ou ovulaire de 2 à 4 µ	NR	NR	Un hyphe	NR
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16 404	<i>CZ.Czapek</i>	Blanches translucide de 4 à 5cm, elles deviennent noires en sporulant	NR	Rondes de 3 à 6 µ	NR	NR	NR	NR

## ANNEXE 8

### *Résultats de l'Activité antioxydante*

**Tableau 1 : Résultats des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en Huile Essentielle**

<b>Absorbance CONTROL = 0,706 nm</b>											
<b>AIGUILLES</b>	<b>µl/50 µL MtoH</b>	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
	<b>µL/ml</b>	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
	<b>µg/ml</b>	89,64	179,28	268,92	358,56	448,2	537,84	627,48	717,12	806,76	896,4
	<b>DO</b>	0,607	0,472	0,418	0,339	0,298	0,253	0,213	0,161	0,099	0,082
	<b>%INHIBITION</b>	14,023	33,144	40,793	51,983	57,790	64,160	69,836	77,195	85,977	88,385
<b>Absorbance CONTROL = 0,707 nm</b>											
<b>BRANCHES</b>	<b>µl/50 µL MtoH</b>	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
	<b>µL/ml</b>	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
	<b>µg/ml</b>	84	168	252	336	420	504	588	672	756	840
	<b>DO</b>	0,454	0,378	0,312	0,262	0,217	0,193	0,16	0,124	0,105	0,079
	<b>%INHIBITION</b>	35,785	46,535	55,870	62,942	69,307	72,702	77,369	82,461	85,149	88,826
<b>Absorbance CONTROL = 0,697 nm</b>											
<b>CONES</b>	<b>µl/50 µL MtoH</b>	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
	<b>µL/ml</b>	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
	<b>µg/ml</b>	87,78	175,56	263,34	351,12	438,9	526,68	614,46	702,24	790,02	877,8
	<b>DO</b>	0,642	0,598	0,559	0,49	0,452	0,413	0,37	0,331	0,313	0,306
	<b>%INHIBITION</b>	7,891	14,204	19,799	29,699	35,151	40,746	46,915	52,511	55,093	56,098

**Tableau 2 : Résultats des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en Acide ascorbique**

<b>Concentration (µg/ml)</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>140</b>	<b>160</b>	<b>180</b>	<b>200</b>
<b>DO (nm)</b>	0,54	0,54	0,44	0,37	0,316	0,295	0,258	0,185	0,068	0,023
<b>%INHIBITION</b>	21,85	21,85	36,32	46,45	54,26	57,3	62,66	73,22	90,15	96,67

