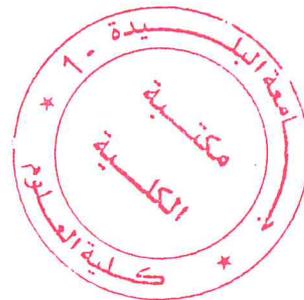


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
OUKIL Ouissem

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière
Filière : Chimie
Option : **Chimie des Substances Naturelles**

Titre

**Etude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir*
Détermination de l'activité antimicrobienne**

Soutenu le 28 septembre 2014 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Président	Université de Blida
Z. Chemat	MCB	Examineur	Université de Blida
M. El Hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida

Promotion 2013-2014

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

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par

OUKIL Ouissem

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : **Chimie des Substances Naturelles**

Titre

Etude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir*
Détermination de l'activité antimicrobienne

Soutenu le 28 septembre 2014 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Président	Université de Blida
Z. Chemat	MCB	Examineur	Université de Blida
M. El Hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida

Promotion 2013-2014

Remerciements

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Pour la fin de mon cursus scolaire, avec toutes les difficultés rencontrées, j'ai fait ce document avec l'aide de tous. Avec la grâce de Allah le tout puissant que je ne remercie jamais assez, qui m'a soutenus tout le long de mes études, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Je tiens aussi à remercier vivement du fond du cœur ma mère et mon père, qui m'ont aidée à arriver à ce niveau. Je leur exprime toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Plus particulièrement, mes respects et mes mille remerciements vont à l'endroit de Mr M. EL HATTAB, Professeur à l'université Blida 1, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, et qui, durant ces deux années m'a gratifiée de son savoir et son aide scientifique avec générosité. Je lui suis profondément reconnaissante pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir orientée et prodiguée ses précieux conseils et critiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail, encore une fois merci.

Mes remerciements vont également au Pr. Y. DAGHBOUCHE et au Dr. N. BOUZIDI, pour leur gentillesse, leurs aides et leurs précieux conseils.

J'adresse mes remerciements particuliers à Mme S. KASMI, Responsable du Master Chimie des Substances Naturelles, et lui voue tous mes respects pour sa modestie, son aide et sa précieuse présence pour l'accomplissement de mon travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Pr. Y. DAGHBOUCHE, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je voudrais également adresser mes sincères remerciements à Mr BOUTOUMI, maître de conférences à l'université Blida 1, pour sa modestie, sa disponibilité et sa sincérité pour nous avoir transmis son savoir.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Dr. BELOUNI et Dr. Ben CHEIKH, de m'avoir permis de réaliser les tests d'activité antimicrobienne au sein de leurs laboratoires (Frantz Fanon et Ben Boulaid) surtout Dr KHEMSI. Je leurs suis grée pour leurs aides, leur gentillesse et leur modestie. Je remercie également Mme REZQ ALLAH, Melle Rym, Mme AICHA, Mme Ouahiba, Mme Amel pour leurs disponibilités et leurs aides dans la réalisation de ces tests.

J'adresse également mes profonds remerciements aux responsables du CHU Frantz Fanon Mr Abd el Nour et Mr Lyes pour leurs gentillesse et leurs soutiens.

Atout les professeurs de la faculté des sciences pour la qualité de la formation qu'ils m'ont donné tous le long de mes études et a ces dirigeants à qui je réitéré mes remerciements.

En guise de reconnaissance, mes sincères remerciements se dirigent vers les membres de ma famille ainsi que tous mes amis.

Je remercie sincèrement tous ceux qui, de prés ou de loin, mon apporté leurs aides en particulier.

Dédicace

*Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,
Nous prions dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance
Et que nous serions enchantés
Par notre travail honoré*



Je dédie ce mémoire à . . .



*Allah le tout puissant qui m'a aidé à accomplir ce modeste travail
et qui m'a donné la force de bien le terminer.*

*A mes parent que j'aime et a qui je doit tous, qui ont sacrifié leur
jeunesse pour bien nous éduquer et qui continuent a se sacrifier
pour que nous ne manquons de rien, ces deux anges gardiens qui
nous ont tant soutenues et qui nous pousse a bien mener notre vie.*

*A mes chères grandes sœurs Amina et son marie abd el Karim,
Amel et son marie Mohamed et mes neveux Adam, Abd el
Rahman, Abd el haie et ma nièce Lina.*

*A ma petite sœur Lamia et à mon adorable frère Kamel et sa
fiancée.*

*A tout ceux qui me connaissent de proche ou de loin sans oublier
mes camarades et mes amis de la promotion.*

Résumé

Le présent travail consiste à l'étude chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Pin noir* récolté à Blida et à la détermination de son activité antimicrobienne ainsi que celle de trois extraits lipidiques de *Pin noir*.

L'huile essentielle a été préparée par hydrodistillation en utilisant clevenger avec un rendement de $4,78 \cdot 10^{-3}$ %. L'huile essentielle obtenue a été ensuite analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) qui a permis de relever la présence de 23 constituants dont nous avons pu identifié exactement 20 produits. Les principaux produits identifiés sont: le D-Limonene, β -Phellandrene, β -cis-Ocimene, α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol, p-Menth-1-en-8-ol, Anisole, 2-isopropyl-5-methyl, Acetate de bornyle, Eugenol, Caryophyllene, α -Caryophyllene, Cadina-3,9-diene, oxyde de caryophyllene, Guaiol, Selina-6-en-4-ol, τ -Eudesmol, Hexadecanal, (7Z, 10Z, 13Z)-7, 10, 13-Hexadecatrienal, Pimara-7, 15-dien-3-one, Labd-14-ene-8, 13-diol, (13R).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose. L'huile essentielle ainsi que les trois extraits ont montré une faible activité vis-à-vis de l'*Enterococcus faecalis*, *Sarcina*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Mots clés : Huile essentielle, extrait, *Pin noir*, activité antimicrobienne.

Abstract

The present work consist on chemical study of the essential oil of *Black pine* species collected at Blida and the determination of its antimicrobial activity and that of three lipid extracts of *Black pine*.

The essential oil was prepared by steam distillation using Clevenger with a yield of $4.78 * 10^{-3}$ %. The essential oil obtained was then analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) which has identified the presence of 23 components which we have found 20 components.

The main products identified were: D-Limonene, β -Phellandrene, β -cis-Ocimene, α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol, p-Menth-1-en-8-ol, Anisole, 2-isopropyl-5-methyl, Bornyl acetate, Eugenol, Caryophyllene, α -Caryophyllene, Cadina-3,9-diene, caryophyllene oxide, Guaiol, Selina-6-en-4-ol, τ -Eudesmol, Hexadecanal, (7Z,10Z, 13Z)-7, 10, 13-Hexadecatrienal, Pimara-7, 15-dien-3-one, Labd-14-ene-8,13-diol,(13R).

Evaluation of the antimicrobial activity was performed by the agar diffusion method. The essential oil and the extracts showed a low activity against *Enterrococcus faecalis*, *Sarcina*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Keywords: essential oil, extract, *black pine*, antimicrobial activity.

ملخص

هذا العمل يركز على الدراسة الكيميائية للزيت الأساسي للسنوبر الأسود المتحصل عليها من البلدية مع تقييم نشاطها المضاد للميكروبات و كذلك المستخلصات الدهنية الثلاثة للسنوبر.

للحصول على الزيت الأساسي استعملنا طريقة التقطير بالبخار باستعمال كلينجر فكان المردود بقدر $4,78 * 10^{-3} \%$ ، و قد تم تحليلها بواسطة الكروماتوغرافيا الطور الغازي مقرونة بمطيافية الكتلة فتحصلنا على 23 مركب حيث حدد منهم بدقة 20 مركب.

أهم المركبات التي تم تحديدها هي : د-ليمونين، β -فيلندران، β -سيس-أوسيمان، α -ميثيل- α -[4-ميثيل-3-بنتيل]أوكسيرانميثانول، p-منت-1-ان-8-أول، أنيزول، 2-إيزوبروبيل-5-ميثيل، أسيتات بورنيل، أوجينول، كاريوفيلان، α -كاريوفيلان، كدينا-3،9-ديين، أوكسيد الكاريوفيلان، قايول، سيلينا-6-ان-4-أول، τ -أوديسمول، هيكزاديكانال، (Z7، Z10، Z13)-7،10،13-هيكزاديكاتريينال، بيمرا-7،15-ديين-3-أون، لابد-14-ان-8،13-ديول، (R13).

تم تقييم النشاطات المضادة للميكروبات باستعمال طريقة الانتشار على الهلام، فأظهرت وجود نشاط جد ضعيف للزيت الأساسي و المستخلصات الدهنية الثلاثة ضد *أوتتروكوكوس فكلي*، *سارسينا*، *كونديدا ألبيكنس*، *ستافيلوكوكوس أوربوس*، *بسودوموناس أيروجينوزا*، *إيشيريشيا كولي*، *بسيلوس سويتيليس*.

الكلمات المفتاحية: الزيت الأساسي، المستخلص، السنوبر الأسود، النشاط المضاد للميكروبات.

Liste des abréviations

ABTS	: 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AMDIS	: Atomique et système d'information sur les données moléculaires
ATCC	: American Type Culture Collection
Ace	: Acétone
°C	: Degré Celsius
C.albicans	: Candida albicans
CG/SM	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CHCl₃	: chloroforme
cm	: centimètre
Cu	: Cuivre
DPPH	: 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl
EtOAc	: acétate d'éthyle
E.faecalis	: Enterococcus faecalis
E.coli	: Escherichia coli
EtOH	: éthanol
FRAP	: Ferric Reducing Antioxydant Power
g	: Gramme
G-	: Gram négative
G+	: Gram positif
h	: heure
l	: litre
m	: mètre
MeOH	: Méthanol
µm	: Micromètre
mg	: milligramme
ml	: millilitre

mm	: millimètre
mn	: minute
OMS	: Organisation mondiale de santé
P	: Pinus, Pin
Pb	: Plomb
%	: Pourcent
SSp	: sous espèce
Subsp	: subspecies
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
Vit C	: Vitamine C

(dans : méthanol, méthanol/chloroforme, l'hexane)

Liste des tableaux

Tableau 1	Diterpènes isolés et activité antimicrobienne des espèces de <i>Pin</i> (<i>Pinus</i>)	7
Tableau 2	Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et des extraits du <i>Pin noir</i>	10
Tableau 3	Produits identifiés dans l'huile essentielle du <i>Pin noir</i> par CG/SM	20
Tableau 4	Les souches de références utilisées dans notre étude	24
Tableau 5	Activité antimicrobienne de l'huile essentielle sur les souches de références	27
Tableau 6	Activité antimicrobienne de l'extrait de <i>Pin noir</i> dans le MeOH sur les souches de références	28
Tableau 7	Activité antimicrobienne de l'extrait de <i>Pin noir</i> dans le MeOH/chloroforme sur les souches de références	28
Tableau 8	Activité antimicrobienne de l'extrait de <i>Pin noir</i> dans l'hexane sur les souches de références	28

Liste des figures

Figure 1	<i>Pinus nigra</i>	3
Figure 2	Biosynthèse des diterpènes	6
Figure 3	Squelette abietane, pimarane et isopimarane	7
Figure 4	Diterpènes isolés des espèces de <i>Pin (Pinus)</i>	10
Figure 5	Situation géographique de la région de récolte	14
Figure 6	Montage Dean Stark	15
Figure 7	Montage de l'hydrodistillation par cleverger	16
Figure 8	Extraction liquide/liquide de l'huile essentielle de <i>Pin noir</i> et séchage sur du sulfate de sodium	16
Figure 9	Extraction liquide /liquide des extraits de <i>Pin noir</i> et séchage sur du sulfate de Sodium	17
Figure 10	Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectroscopie de mass	18
Figure 11	Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle du <i>Pin noir</i>	22
Figure 12	Illustration de la méthode des antibiogrammes	25
Figure 13	Aromatogrammes des bactéries à Gram positif testées avec l'huile essentielle de <i>Pin noir</i>	29
Figure 14	Aromatogrammes des bactéries à Gram négatif testées avec l'huile essentielle de <i>Pin noir</i>	29
Figure 15	Aromatogramme du <i>C. albicans</i> testé avec l'huile essentielle de <i>Pin noir</i>	30
Figure 16	Aromatogrammes des bactéries à Gram positif testées avec les extraits de <i>Pin noir</i> (dans : méthanol, méthanol/chloroforme, l'hexane)	30
Figure 17	Aromatogrammes des bactéries à Gram négatif testées avec les extraits de <i>Pin noir</i> (dans : méthanol, méthanol/chloroforme, l'hexane)	31
Figure 18	Aromatogramme du <i>C. albicans</i> testé avec les extraits de <i>Pin noir</i>	31

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
Introduction	3
I. 1 Position systématique et description du <i>Pin noir</i>	3
I. 1.1 Position systématique du <i>Pin noir</i>	3
I. 1.2 Description du <i>Pin noir</i>	3
I. 2 Répartition et distribution géographique du <i>Pin noir</i>	3
I. 3 Etude chimique du genre <i>Pinus</i>	4
I.3.1 Généralités sur les terpènes	4
I. 3.1.1 Définition	4
I. 3.1.2 Biosynthèse des diterpènes	5
I.3.2 Métabolites secondaires isolés du genre <i>Pin</i>	7
I.3.2.1 Diterpènes isolés des espèces de <i>Pin (Pinus)</i> et activités biologiques	7
I.4 Etude chimique de l'huile essentielle et des extraits de <i>Pin noir</i>	11
I.4.1 Etude chimique de l'huile essentielle de <i>Pin noir</i>	11
I.4.2 Etude chimique des extraits de <i>Pin noir</i>	11
I.5 Activité biologique de l'huile essentielle et des extraits de <i>Pin noir</i>	12
Chapitre II : Partie expérimentale	
Introduction	13
II.1 Etude chimique de l'huile essentielle de <i>Pin noir</i>	13

II.1.1 Matériel végétal	13
II.1.1.1 Choix du matériel végétal	13
II.1.1.2 Lieu et date de récolte de l'espèce étudiée	13
II.1.1.3 Identification de l'espèce étudiée	14
II.1.1.4 Conservation	15
II.1.1.5 Détermination du taux d'humidité.....	15
II.1.2 Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle	15
II.1.2.1 Description du dispositif d'extraction.....	15
II.1.2.2 Traitement et récupération de l'huile essentielle (extraction liquide-liquide de l'huile essentielle)	16
II.1.3 Préparation des extraits de <i>Pin noir</i>	17
II.1.3.1 Procédé utilisé.....	17
II.1.3.2 Traitement et récupération des extraits.....	17
II.1.4 Calcul du rendement	18
II.1.5 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	18
II.1.5.1 Conditions opératoires	18
II.1.6 Résultats et discussion de l'étude chimique	19
II.1.6.1 Taux d'humidité.....	19
II.1.6.2 Propriétés caractéristiques de l'huile essentielle et des extraits lipidiques du <i>Pin noir</i>	19
II.1.6.3 Rendement en huile essentielle et extrait lipidique	20
II.1.6.4 Analyse de l'huile essentielle de <i>Pin noir</i> par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	20
II.1.6.4.1 Discussion de la composition chimique de l'huile essentielle du <i>Pin noir</i>	23
II.2 Etude de l'activité antimicrobienne	23
II.2.1 Tests d'activité antimicrobienne.....	23
II.2.1.1 Lieu de travail	23
II.2.1.2 Matériel microbien.....	23
II.2.1.2.1 Milieux de cultures	24

II.2.2 Etude qualitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits lipidiques par la méthode de diffusion sur milieu solide «Méthode de Vincent»	24
II.2.2.1 Principe	24
II.2.2.2 Technique	25
II.2.3 Résultats et discussion des tests d'activités antibactérienne et antifongique.....	27
II.2.3.1 Résultats obtenus	27
II.2.3.2 Discussion des résultats	31
Conclusion.....	33

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION
GENERALE

Introduction générale

Le genre *Pinus* (*Pinaceae*), avec plus de 200 espèces généralement reconnues, est le plus grand genre actuel de Pinopsida. Il est objet d'intérêt puisqu'il représente un réservoir inépuisable en produits pouvant être valorisés dans divers secteurs.

Sur le plan économique, les *Pins* sont l'une des espèces d'arbres les plus importants d'une valeur pour le bois, le papier, les résines, charbon de bois, de la nourriture (en particulier les graines) et les plantes ornementales. En outre, la plupart des *Pins* sont considérés comme source importante de structures diverses, des composés bioactifs, et ont fourni des contributions à la découverte d'agents pharmaceutiques et d'autres applications biomédicales. Par exemple, l'essence de térébenthine a une longue tradition d'utilisation pour le traitement des maladies rhumatismales tandis que l'extrait d'écorce de *Pin* est utilisé en cosmétique anti-âge. Cependant, les huiles essentielles de *Pinus* ont été rapportées pour avoir une variété de propriétés thérapeutiques. Selon Dervendzi, les huiles d'aiguilles de *Pin* sont principalement utilisés dans la médecine populaire pour la guérison des infections respiratoires accompagnés de toux, la bronchite, l'asthme bronchique, emphysème, trachéite, sinusite, laryngite, pharyngite, et la grippe. En outre, les huiles de *Pin* sont largement utilisées comme additifs aromatisants pour aliments et boissons. Dans divers produits de nettoyage domestique, ils sont bien connus comme parfum et agents désinfectant. De plus, ces huiles sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique comme arôme ou une source naturelle des intermédiaires dans la synthèse des composants de parfum [1].

L'oléorésine de *Pin* est un produit forestier important qui est traditionnellement obtenu en appuyant sur l'écorce de *Pin* (écaillage d'écorce) et de la collecte de l'exsudat résultant. Les oléorésines sont des mélanges complexes de diterpènes acides et neutres avec une fraction plus ou moins importante de composés volatils (mono et sesquiterpènes).

Dans l'industrie, l'oléorésine brut est converti par distillation à la vapeur en gomme térébenthine (composés volatils) et en colophane (diterpènes), les gommes sont à leur tour transformés en produits chimiques industriels tels que des gommes alimentaires, des adhésifs, des revêtements, des encres d'imprimerie, des désinfectants, nettoyeurs, produits pharmaceutiques, des parfums et arômes [2].

Traditionnellement, la résine de *Pin* a été utilisée pour traiter l'inflammation, pour soulager les symptômes de la toux et pour soulager la douleur. En médecine chinoise, la résine de *Pin* est utilisé pour le traitement des maladies de la peau, des brûlures et des blessures de brûlure, trachitis, la tuberculose pulmonaire et comme un bon antiseptique, Les

études modernes ont montré que la résine de *Pin* se compose principalement de constituants chimiques d'acides diterpéniques d'abiétane et de pimarane, qui auraient beaucoup de fonctions biologiques et pharmacologiques, y compris anti-tumorale, anti-inflammatoire, pesticide, et des propriétés antibactériennes, ainsi que pour diminuer le cholestérol [3].

L'écorce de *Pin* pourrait être un bio-adsorbant intéressant avec un potentiel d'augmenter la rétention des métaux lourds dans les milieux pollués, elle peut être aussi utilisée pour enlever et retenir Pb et Cu à partir des milieux pollués, comme ce pourrait être des métaux lourds des eaux usées polluées. L'utilisation de bio-adsorbants pour retenir les métaux lourds peut augmenter la durabilité environnementale de différents milieux, tels que les sols agricoles [4].

Les cônes de certaines espèces de conifères trouvés des utilisations dans l'industrie. Constituants d'huiles essentielles des cônes de la famille des *Pinacées* sont mal connus, mais il y a eu quelques études sur l'activité anti-oxydante, les terpènes, les stéroïdes, l'activité anti-VIH, procyanidines... etc de tous les cônes *Pinaceae* [5].

Les espèces de *Pin* (*P.brutia*, *P.halepensis*, *P.nigra*, *P.pinea* et *P.sylvestris*) sont les sources potentielles de métabolites actifs avec la cholinestérase et des propriétés antioxydantes [6].

Le genre *Pin* appartient à l'une des familles les plus importantes du règne végétale, qui est la famille des *Pinacées*. Il a fait l'objet de plusieurs études à cause des propriétés thérapeutiques de la majorité des espèces appartenant à ce genre.

Notre travail entre dans le cadre de la valorisation de l'espèce *Pin noir* et porte sur l'étude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir* et de son activité antimicrobienne ainsi que celle des extraits lipidiques, il est réparti en deux chapitres :

Le premier est consacré à une synthèse bibliographique.

Le deuxième à la partie expérimentale comprenant l'étude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir* ainsi qu'à la détermination des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle et des extraits lipidiques.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Introduction

Les *Pinacées* (*Pinaceae*) constituent une grande famille d'arbres monoïque, qui comprend la majeure partie des espèces de conifères que l'on rencontre au Québec [7].

La famille des *Pinacées* est divisée en 8 genres qui sont : *Sapin* (*Abies*), *Epicéa* (*Picea*), *Douglas*, *Tsuga*, *Cèdre* (*Cedrus*), *Mélèze* (*Larix*), *Pin* (*Pinus*) [8], *Pseudotsuga* [9] et forme l'une des familles les plus importantes de conifères ou résineux.

Les *Pinacées* sont aujourd'hui utilisées en aromathérapie et en cosmétique et parmi ces espèces on trouve le *Pin noir* qui grâce à ses différents effets thérapeutiques, toutes les parties de cette espèce sont employées en médecine (la résine: pour traiter les maladies de la peau, la tuberculose pulmonaire, l'inflammation, cône: anti-VIH...etc) [3].

I. 1 Position systématique et description du *Pin noir*

I. 1.1 Position systématique du *Pin noir*

Selon Meyen (1984) [10], *Pinus nigra* (*Pin noir*) est répertoriée comme suit :

Règne : Plantae

Division : Pinophyta

Classe : Pinopsida

Ordre : Pinales

Famille : *Pinaceae*

Genre : *Pinus*

Espèce : *Pinus nigra*



Figure 1 : *Pinus nigra*

I. 1.2 Description du *Pin noir*

Pinus nigra est un arbre qui peut atteindre jusqu'à 30 m de hauteur avec une écorce gris foncé à noirâtre. Les aiguilles sont vert foncé, rigides et souvent incurvés. Le Cône est ovoïde, dressé ou ascendant et les bourgeons résineux [11].

I. 2 Répartition et distribution géographique du *Pin noir*

Pinus nigra Arnold est une espèce «illyriennes», qui pousse sur les falaises calcaires arides; en Italie, il est distribué dans l'Alpes orientales et certains endroits dispersés dans les

Abruzzes, Campanie et l'Apennin; cependant, il est largement cultivé dans les zones de montagne [12].

Le *Pin noir* Européen (*Pinus nigra* JFArnold) est l'un des plus répandus des conifères et polymorphes en Europe. Il couvre les zones extrêmement fragmentées autour de la région nord de la Méditerranée, de l'Espagne à l'Asie Mineure, l'extension à l'Autriche et le nord-est de la Crimée et on le trouve aussi dans les hautes montagnes du Maghreb en Afrique du Nord conformément à la diversité géographique et écologique de son habitat, sa répartition disjointe et sa longue histoire, le *Pin noir* est une espèce extrêmement variable [13].

Pinus nigra Arnold (du *Pin noir* Européen) est originaire d'Europe et d'Asie. L'espèce est divisée en cinq sous-espèces: *P.nigra* subsp. *nigra* Autriche, centre d'Italie, la Grèce; *P.nigra* subsp *salzmanni*, Cévennes et les Pyrénées (France), le centre et l'Est en Espagne; *P.nigra* subsp *dalmatique*, région côtière et les îles de l'Ouest de la Yougoslavie; *P.nigra* subsp *pallasiana*, péninsule des Balkans, les Carpates du Sud; *P.nigra* subsp *laricio*, la Calabre, la Sicile (Italie) et la Corse (France) [14].

I.3 Etude chimique du genre *Pinus*

Les principaux métabolites secondaires rencontrés dans les espèces du genre *Pinus* étant des mono-, di- et des sesquiterpénoides. Nous commençons par donner quelques notions théoriques sur les composés terpéniques.

I.3.1 Généralités sur les terpènes

I.3.1.1 Définition

Les terpènes constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possèdent des propriétés antiseptiques [15], d'où divers emplois dont l'embaumement qui est resté dans les termes baume et balsamique [16].

Les terpènes jouent un rôle important dans la défense des plantes comme des composés antimicrobiens contre les champignons et les bactéries [17].

Les terpènes sont des hydrocarbures non azotés, très réactifs. Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone...etc). Ils n'ont pas une fonction universelle et sont différemment représentés dans les différentes familles, dans les genres et espèces [18].

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette

d'une unité isoprénique (C_5H_8) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène est à la base du concept de la règle isoprénique énoncée en 1953 par Lynen et Ruzika et complété par Bloch et collaborateurs [19, 20].

I.3.1.2 Biosynthèse des diterpènes

Les diterpènes sont constitués de quatre unités isopréniques (20 carbones) et sont formés dans les plastides à partir du géranylgeranyl diphosphate (GGPP) [16].

Biogénétiquement, les terpènes ont pour précurseur l'acide mévalonique, obtenu par activation enzymatique d'une molécule d'acide acétique [21]. La phosphorylation et la décarboxylation qui suivent aboutissent à une unité de base : le pyrophosphate de 3-isoprényle (PPI-3). Cette unité est isomérisée en pyrophosphate de 2-isoprényle (PPI-2) qui joue le rôle d'agent alkylant envers d'autres groupes PPI-3. Selon le nombre d'unités isopréniques fixées, on obtient par le pyrophosphate de géranylgeranyle (PPGG), les diterpènes (20 atomes de carbone) (figure2). Les composés issus de cette sous-classe peuvent, par diverses réactions enzymatiques (cyclisation, oxydation...etc) aboutir à un très grand nombre de produits naturels [22].

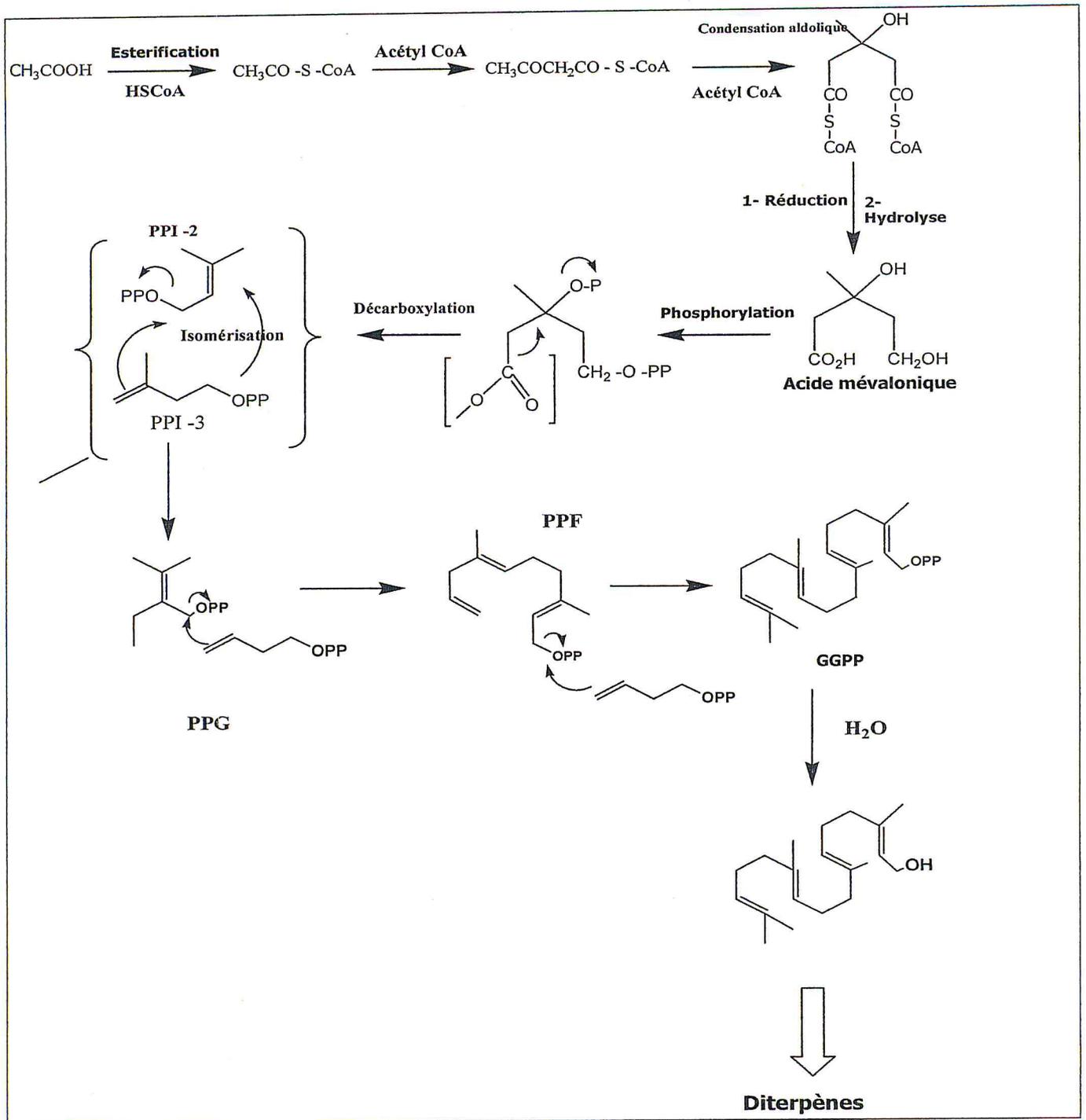


Figure 2 : Biosynthèse des diterpènes

I.3.2 Métabolites secondaires isolés du genre *Pin*

Différents travaux de recherche portant sur l'étude chimique ont été menés sur des espèces du genre *Pinus*. Ils ont conduit à l'isolement de diverses structures terpéniques, notamment des diterpènes.

I.3.2.1 Diterpènes isolés des espèces de *Pin* (*Pinus*) et activités biologiques

Nous avons constaté que les diterpènes isolés de diverses parties des espèces de *Pin* comme les bourgeons, aiguilles, cônes, troncs...etc possèdent tous une structure tétracyclique appartenant au squelette de l'abiétane, du pimarane et de l'isopimarane (figure 3).

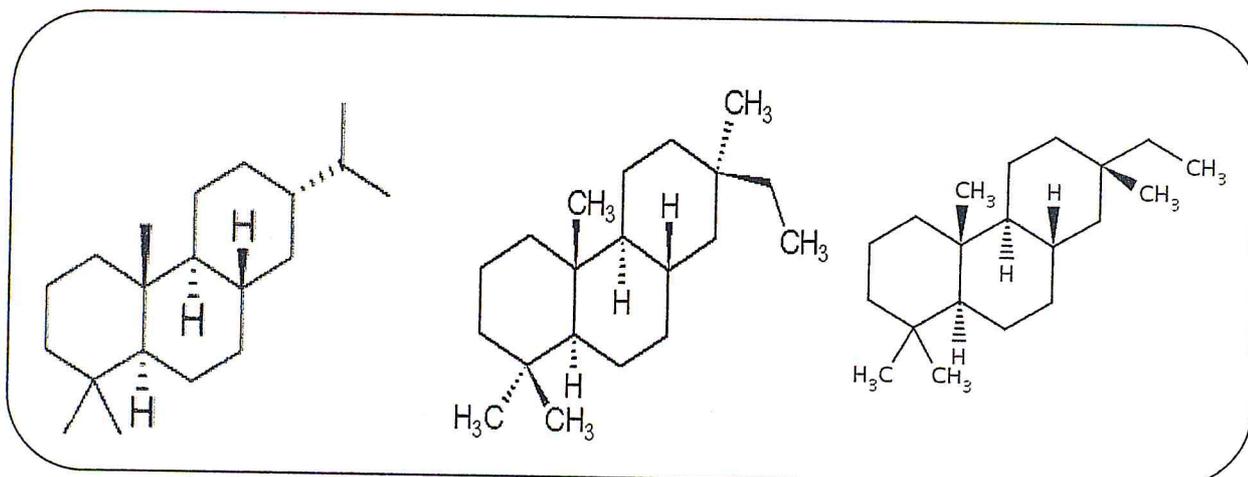


Figure 3 : Squelette abiétane, pimarane et isopimarane

Tableau 1: Diterpènes isolés et activité antimicrobienne des espèces de *Pin* (*Pinus*)

Espèce	partie utilisée	Diterpène	Extraction	activité antimicrobienne	Référence
<i>Pinus banksiana</i> <i>Pinus lamb</i>	Bourgeons	1)acide7 α -hydroxyabieta-8,11,13,15-tétraén-18-oïque 2)7 β ,15,18-trihydroxyabieta-8,11,13-triéne 3)13,15-dihydroxypodocarpa-8,11,13-triéne	hexane,CH ₂ Cl ₂ et méthanol (extraction au Soxhlet)	Contre S.aureus G+et Echerichia coli G-	[23]

<i>Pinus sylvestris</i>	Aiguille	Acide abiétique et pimarique «acides résiniques»	Méthanol/ Dichlorométhane 1/1 (v/v)		[24]
<i>Pinus</i> 1) <i>pinea</i> , 2) <i>halepensis</i> 3) <i>brutia</i>	Cône	Acide abiétique	Extraction en deux étapes n-hexane puis acétone : eau (95 :5, v v ⁻¹)		[25]
<i>Pinus sylvestris</i>	Cône	acide déhydroabietique	Extraction en deux étapes n-hexane puis acétone : eau (95 :5, v v ⁻¹)		[25]
<i>Pinus nigra</i>	Cône	Acide isopimarique	Extraction en deux étapes n-hexane puis acétone : eau (95 :5, v v ⁻¹)		[25]
<i>Pinus taeda</i>	Tronc d'arbre adulte	1)Acide pimarique 2)acide isopimarique 3)acide déhydroabietique 4)acide 12 α ,13 β - dihydroxyabiet- 8(14)-en-18-oïque 5)acide 7 α ,9 α ,11 α - trihydroxyabiet- 8(14)-en-18-oïque	Macération avec de l'éthanol		[26]

<i>Pinus ponderosa</i>	l'oléorésine de xylem de la tige	Acide abiétique	L'oléorésine distillée pendant 2 heures	Contre Bactéries Gram+	[27]
<i>Pinus nigra</i> (ssp laricio)	Aiguille	Oxyde de manoyle	Hydrodistillation par clevenger pendant 5h		[21]

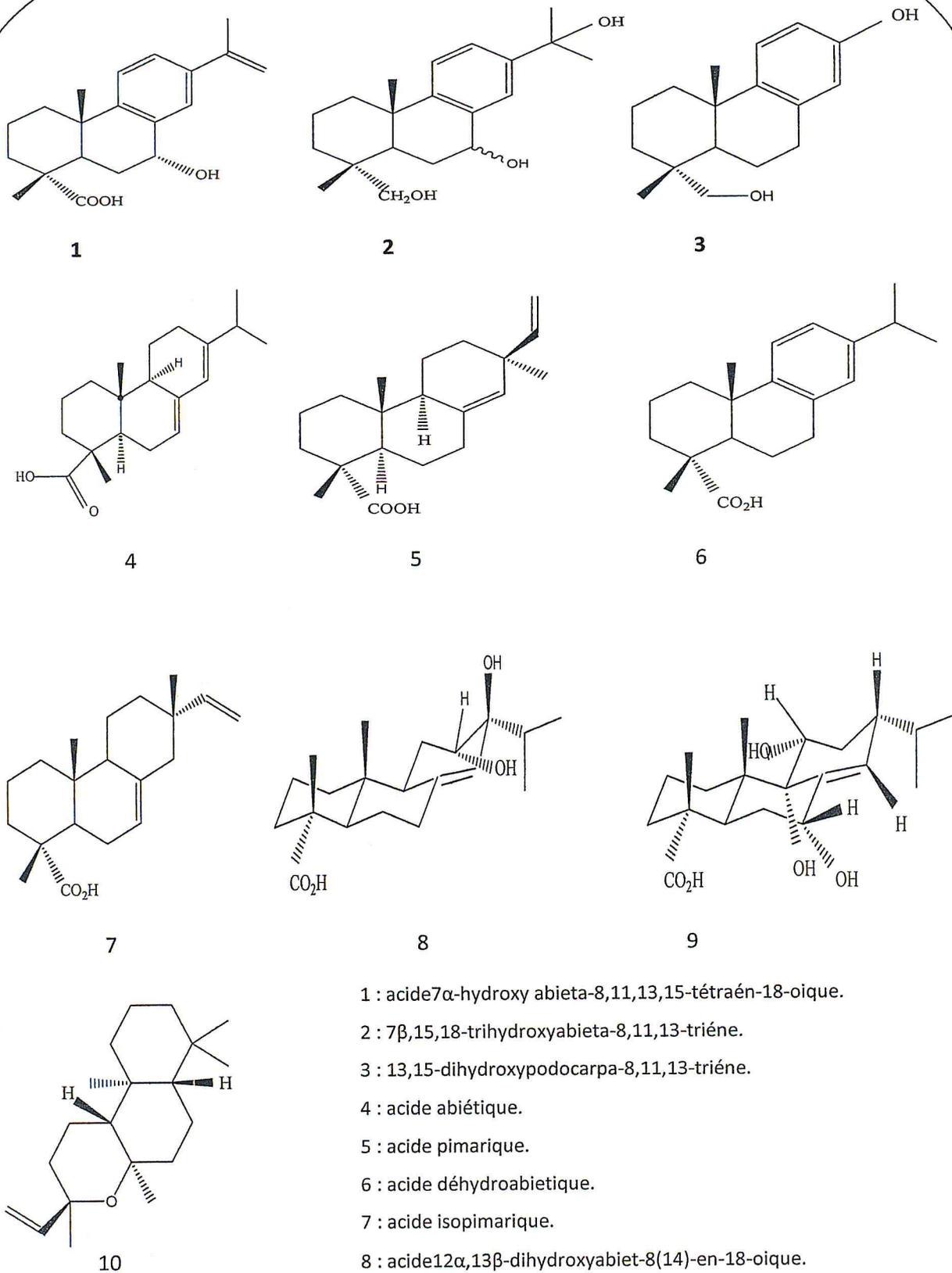


Figure 4 : Diterpènes isolés des espèces de *Pin* (*Pinus*)

I.4 Etude chimique de l'huile essentielle et des extraits de *Pin noir*

I.4.1 Etude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir*

Les huiles essentielles des différentes parties de *Pin noir* (aiguille, cône, branche) et provenant de différents pays (autres que l'Algérie) ont fait l'objet de plusieurs études ayant mené à l'identification de la composition chimique, ainsi qu'à l'étude des activités biologiques.

Les huiles essentielles ont été préparées par hydrodistillation en utilisant un clevenger avec un rendement allant de 0,08 à 1,6% [5, 14, 28, 30].

La composition des huiles essentielles d'aiguille de *Pin noir* a montré la présence de quinze composés de nature terpénique dont les principaux sont: α -pinène (2,1-52%), β -pinène (21,3-67%), limonène (0,5-5,1%), D-germacrène (0,06-17,8%) et l'acétate de bornyle (0,3-3,3%) [12, 13, 28, 29]. On constate une alternance au niveau du produit majoritaire une fois c'est l' α -pinène [5, 6, 12, 13] et l'autre fois c'est l'oxyde de manoyl [28, 30], ou quelques fois absence d'oxyde de manoyl [6, 12].

Les études sur les huiles essentielles des cônes et des branches, quant à eux, ont révélé la présence de l' α -pinène (45,36-49,5%) comme produit majoritaire. Toutefois, le D-germacrène, le phényléthyl-3-méthyl butanoate et le pimaradiène se trouvent uniquement dans les branches avec des teneurs respectives de 0,5%, 0,1% et 0,1%. De même pour les cônes, on note la présence de l' α -cubène, longicyclène, l' α -copaène trans- γ -cadinène, guaïol...etc [12].

Cette variation dans la composition de l'huile essentielle est probablement due aux lieux et aux périodes de récolte, aux sous-espèces qui doivent être différentes.

I.4.2 Etude chimique des extraits de *Pin noir*

Les rameaux et aiguilles de *Pin noir* ont été séparés et séchés à l'ombre à la température ambiante. Les échantillons secs ont été broyés en une poudre fine dans un broyeur mécanique et pesés avec précision. Ensuite, chaque partie de la plante a été extraite successivement à la température ambiante pendant 3 jours avec de l'acétone (Ace), l'acétate d'éthyle (EtOAc), et de l'éthanol (EtOH). Après filtration, les phases organiques ont été concentrées sous vide dans un évaporateur rotatif pour obtenir des extraits bruts.

Les extraits des aiguilles et des brindilles de *Pin noir* ont montré la présence des phénols et des flavonoïdes. Pour les extraits de brindilles dans l'acétate d'éthyle, l'éthanol et l'acétone, nous avons noté l'absence des flavonoïdes.

La teneur en phénol des extraits d'aiguille de *Pin noir* sont de 23,5% pour l'extrait acétonique, 63,14% pour l'extrait obtenu avec l'acétate d'éthyle et 77% pour l'extrait éthanolique, tandis que, la composition en flavonoïdes présente des teneurs allant de 9,99% pour l'extrait dans l'acétate d'éthyle, 11,37% pour l'extrait dans l'éthanol à 44,6% pour l'extrait dans l'acétone.

Le contenu en phénol totaux des extraits des brindilles varie de 24,06% pour l'extrait dans l'acétate d'éthyle à 34,31% pour l'extrait dans l'éthanol [6].

I.5 Activité biologique de l'huile essentielle et des extraits de *Pin noir*

Les études effectuées sur les huiles essentielles et les extraits de *Pin noir* ont montré qu'ils manifestent un important potentiel antioxydant. Cependant, l'huile essentielle présente une activité antibactérienne et antifongique.

Les activités antibactérienne, antioxydante et antifongique effectuées sur l'huile essentielle d'aiguille de trois taxons de *Pinus nigra* de la Serbie (ssp. *nigra*, ssp. *pallasiana*, var. *banatica*) ont montré une faiblesse des propriétés antioxydantes (testées par les méthodes de DPPH et au balayage à l'ABTS), l'activité la plus élevée a été identifiée dans *P.nigra* var.*banatica* (IC₅₀=25,08 mg/ml et VitC=0,67mg (vitamine C)/g).

Concernant l'activité antimicrobienne, un champignon (*Aspergillus Niger*) et deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) ont montré une sensibilité aux huiles essentielles de trois taxon de *P.nigra*, ces huiles testées ont révélé une action inhibitrice dans la plage allant de 0,62 à 20mg/ml, où la var. *banatica* montre une activité antimicrobienne plus intéressante que la variété *nigra* [1].

L'huile essentielle de *P. nigra* ssp.*dalmatica* n'a pas montré une activité antioxydante significative, cette huile montre une activité biologique (inhibition de l'acétylcholinestérase) [29].

Les extraits à l'éthanol, acétone, acétate d'éthyle et les huiles essentielles des brindilles et des aiguilles de *P. nigra* ont montré une activité antioxydante, cette dernière a été mesurée en utilisant le DPPH et le pouvoir antioxydant (FRAP) des dosages de réduction ferriques [6].

Chapitre II

Partie expérimentale

Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir* et de son activité antimicrobienne ainsi que celle de trois extraits lipidiques. Il est réparti en deux parties:

- 1- Etude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir*.
- 2- Etude de l'activité antimicrobienne.

L'extraction de l'huile essentielle et la préparation des extraits lipidiques ont été réalisés au laboratoire de chimie des substances naturelles (département de chimie de l'Université Saad Dahlab de Blida), alors que l'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au sein du laboratoire de l'Institut National de Criminalistique et de Criminologie INCC-Chéraga-Alger.

Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés au sein de l'unité bactériologique du laboratoire centrale (CHU) de l'hôpital Frantz Fanon et du centre hospitalo-universitaire Ben Boulaid de Blida.

II.1 étude chimique de l'huile essentielle de *Pin noir*

II.1.1 Matériel végétal

II.1.1.1 Choix du matériel végétal

Les critères qui nous ont conduits à choisir cette espèce pour l'étude sont :

- Sa place dans la systématique, d'où elle appartient à la famille des *Pinacées* qui est l'une des plus importantes familles du règne végétal.
- L'endémicité de l'espèce nous a incité à investiguer la composition de son huile essentielle.
- Les activités biologiques assignées aux plantes de la famille des *Pinacées* et particulièrement le genre *Pin*.
- En Algérie, il n'y a pas eu de travaux qui ont été consacrés à cette plante.
- Les résultats des études phytochimiques obtenus des autres espèces du même genre *Pin* ; richesse en métabolites secondaires.

II.1.1.2 Lieu et date de récolte de l'espèce étudiée

Les aiguilles (feuilles) du *Pin noir* utilisées dans cette étude ont été récoltées durant la période s'étalant du mois de mars à mai 2014 au niveau de l'hôpital Frantz Fanon (juin ville, commune de Blida) dans la wilaya de Blida (figure 5).

La région de Blida possède un climat méditerranéen c'est-à-dire tempère sec et assez chaud en été, doux et humide en période hivernale, la pluviométrie est généralement plus importante dans les montagnes que dans la plaine. Les précipitations sont plus importantes en mois de décembre, janvier et février.

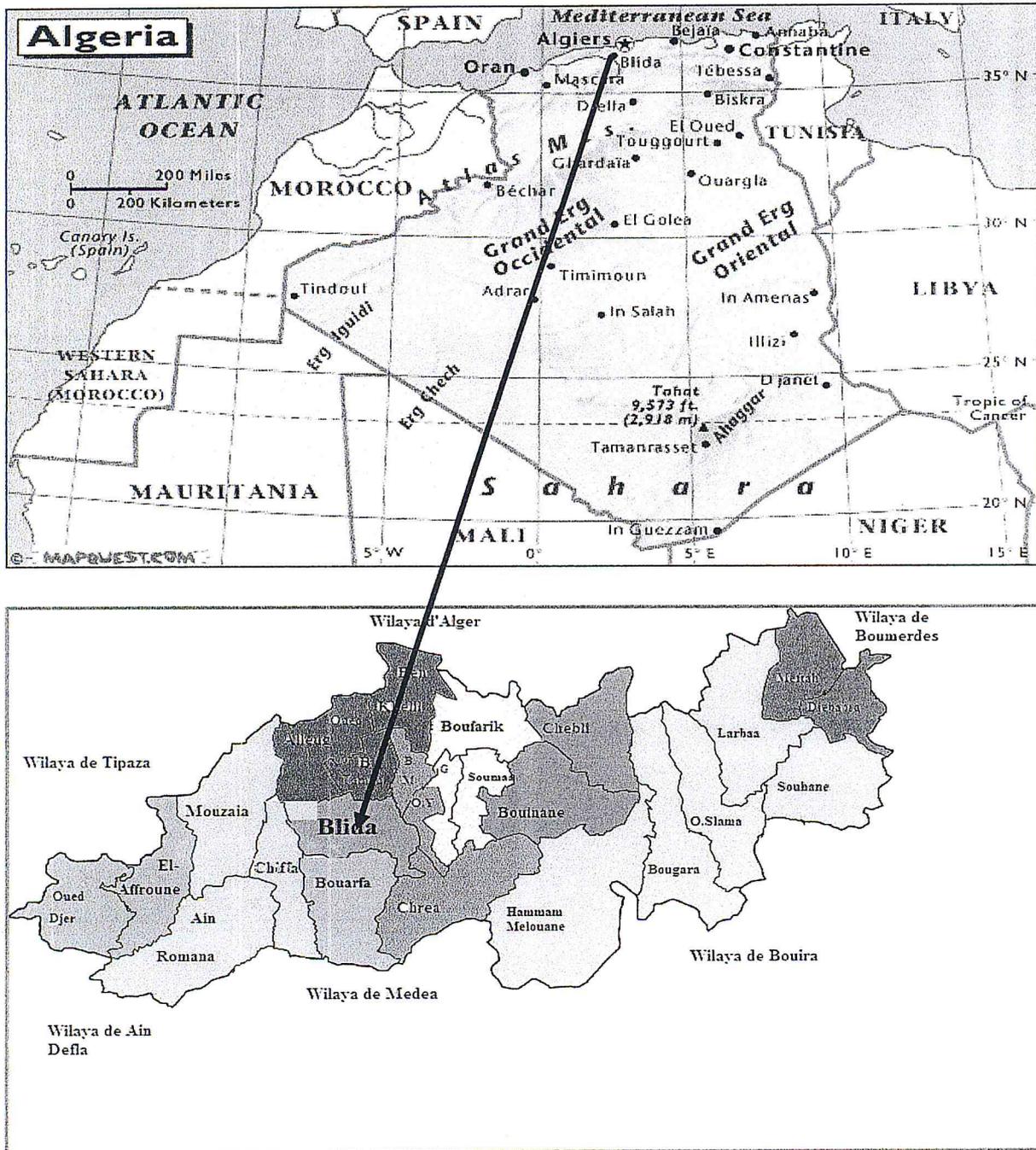


Figure 5 : Situation géographique de la région de récolte

II.1.1.3 Identification de l'espèce étudiée

L'identification de l'espèce a été faite par un expert forestier au niveau du Parc National de Chrea et chercheur à l'Institut National d'Agronomie-Alger.

II.1.1.4 Conservation

Les aiguilles fraîchement récoltées sont soumises à un tri manuel, coupées en petites morceaux et séchées à l'ombre dans un endroit propre, sec et aéré.

A l'état sec, les aiguilles sont conservées dans un carton. Il faut noter qu'avant chaque manipulation, une quantité des aiguilles sont utilisées pour la mesure du taux d'humidité.

II.1.1.5 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la plante (aiguilles) a été déterminé en utilisant le montage de Dean Stark (figure 6), le procédé consiste à mettre 5g d'aiguilles auquel on ajoute du toluène (50ml) jusqu'à immersion totale des aiguilles, ensuite on porte à ébullition.

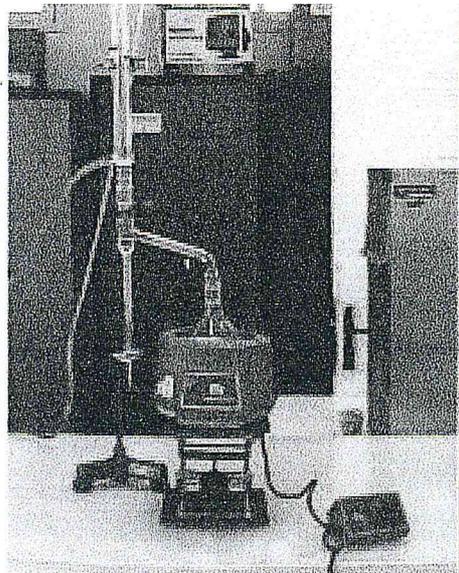


Figure 6 : Montage Dean Stark

II.1.2 Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle

II.1.2.1 Description du dispositif d'extraction

On introduit la matière végétale (200g d'aiguilles) dans un ballon de 2 litres (figure 7), puis on ajoute de l'eau distillée jusqu'à la couvrir complètement. On porte à ébullition le mélange, ce qui provoque la formation d'un hétéroazéotrope eau-huile essentielle, dont les vapeurs sont condensées au niveau du réfrigérant pour donner un distillat. Ce dernier est constitué d'eau et d'huile essentielle à l'état liquide.

L'huile essentielle étant immiscible avec l'eau, le mélange forme un liquide légèrement trouble sur lequel surnage une fine couche huileuse.

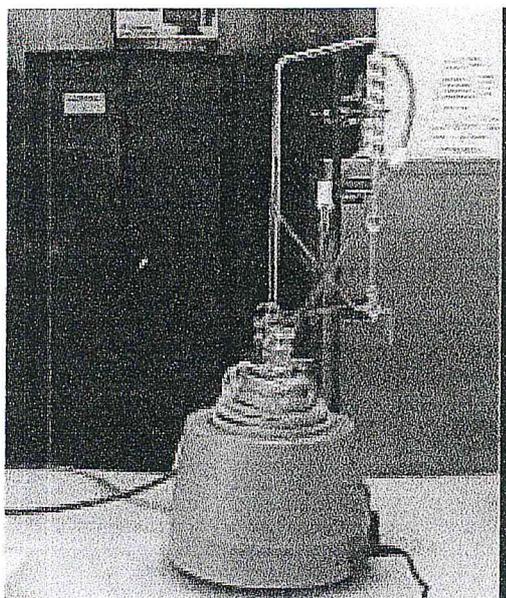


Figure 7 : Montage de l'hydrodistillation par clevenger

II.1.2.2 Traitement et récupération de l'huile essentielle (extraction liquide-liquide de l'huile essentielle)

L'hydrolat recueilli est extrait avec l'éther diéthylique, on obtient alors deux phases : une phase organique contenant l'huile essentielle et une phase aqueuse. Cette opération est répétée deux fois afin d'épuiser complètement l'huile essentielle. Les phases organiques obtenues de chaque extraction sont regroupées et filtrées sur un papier filtre contenant du sulfate de sodium (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute traces d'eau (Figure 8). On procède après à l'évaporation du solvant par le rotavapeur.

L'huile essentielle ainsi obtenue, est conservée dans des flacons hermétiquement fermés et stocké dans un endroit sombre à 4°C .

La différence du poids des flacons vides et ceux remplis d'huile essentielle constitue la masse de l'huile essentielle.

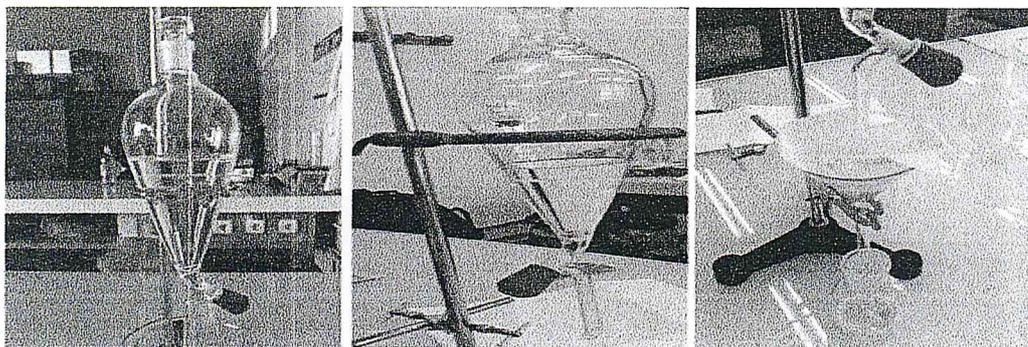


Figure 8 : Extraction liquide/liquide de l'huile essentielle du *Pin noir* et séchage sur du sulfate de sodium

II.1.3 Préparation des extraits de *Pin noir*

II.1.3.1 Procédé utilisé

Pour préparer nos extraits on a utilisé le procédé de macération, qui consiste à laisser séjourner ou macérer la plante (aiguilles) dans un solvant organique à froid pendant quelques jours (une semaine) pour extraire le maximum de principes actifs de cette plante. Cette technique met en jeu un solvant organique (dans notre cas le méthanol, le mélange méthanol/chloroforme à une proportion de 50/50 et l'hexane) et la plante (aiguilles du Pin noir).

II.1.3.2 Traitement et récupération des extraits

Après l'étape de macération on récupère notre solution par filtration sur papier filtre, on obtient la plante qu'on a macéré et un filtrat qui est le miscella (solvant+extrait) contenant les composants de la plante dissout dans le solvant organique.

On évapore le solvant organique avec le rotavapeur puis on récupère l'extrait auquel on ajoute une quantité d'éther diéthylique et d'eau distillée pour réaliser une extraction liquide-liquide. Il s'agit des mêmes étapes effectuées précédemment dans le traitement de l'huile essentielle, mais dans ce cas le produit obtenu est un extrait brut (figure 9).

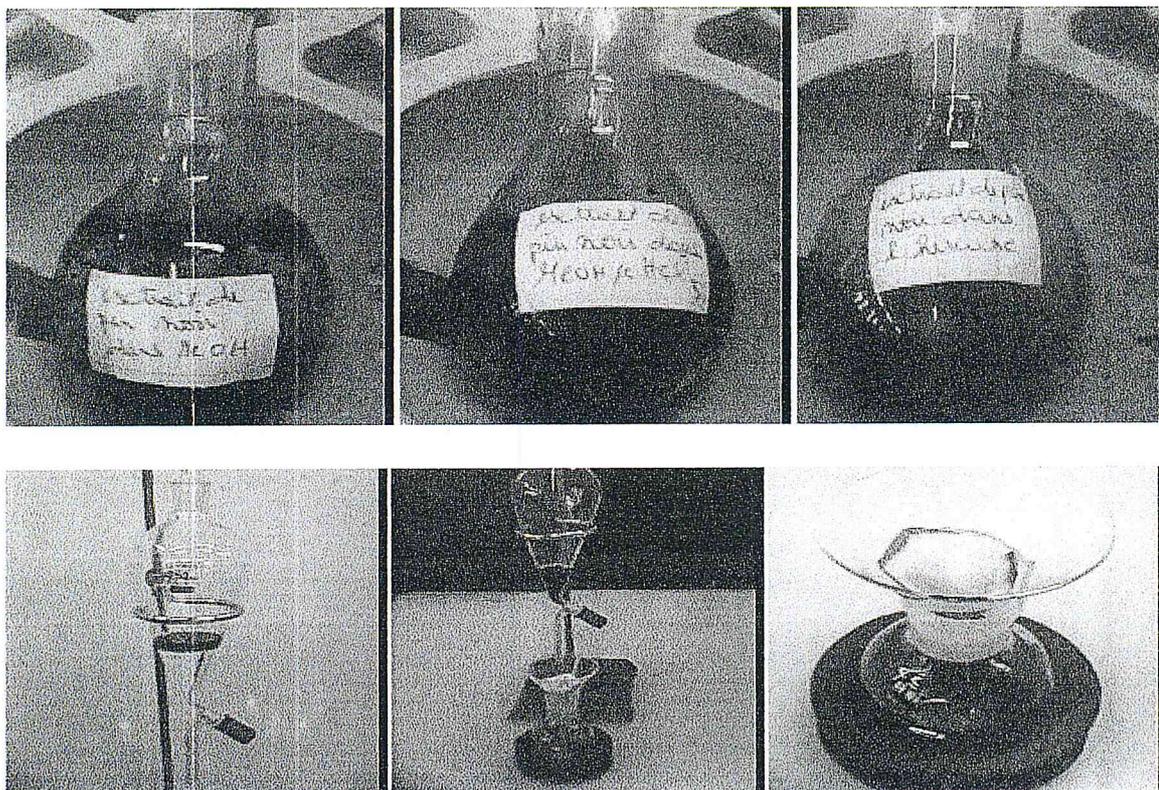


Figure 9 : Extraction liquide/liquide des extraits du *Pin noir* et séchage sur du sulfate de sodium

II.1.4 Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle ou en extrait est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle ou de l'extrait et la masse de la plante (aiguilles) utilisée sec. Le rendement est exprimé en pourcentage et calculée en utilisant la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{m_{H,E,E}}{m_{MV}} \times 100$$

R : rendement en huile essentielle ou en extrait (%)

$m_{H,E,E}$: masse de l'huile essentielle ou de l'extrait (g)

m_{MV} : masse de la matière végétale utilisée (g)

II.1.5 Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse de la composition chimique de notre huile essentielle a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'identification des différents composés de l'huile essentielle est effectuée en se basant sur la banque de données spectrales Amdis-Nist.

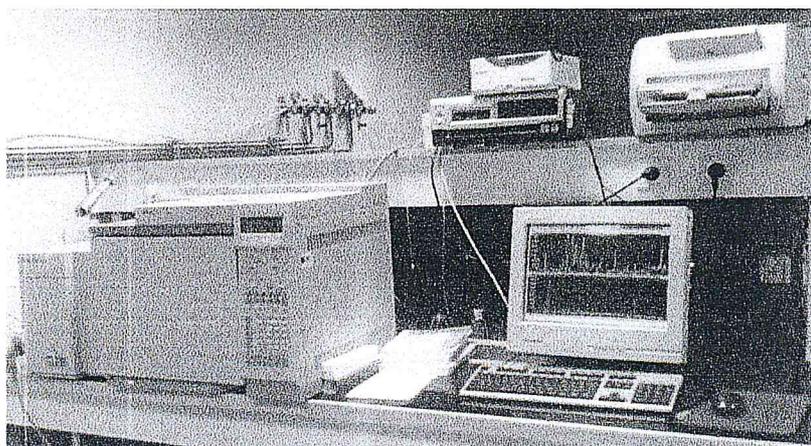


Figure 10 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectroscopie de masse

II.1.5.1 Conditions opératoires

L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Trace GC Ultra couplé à un spectromètre de masse de type DSQ II, dans les conditions suivantes :

- La colonne capillaire de type HP-5 et de dimensions: 0.1 μ m x 0.32 mm x 30 m (épaisseur du film, diamètre interne, longueur).
- Un potentiel d'ionisation du spectromètre de masse égale a 70 eV.

- Le programme du four est : 80°C (3') -3°/mn -280°C (10').
- Gaz vecteur est l'hélium à un débit de 1ml/mn .
- Injection en mode split splitless : 1/10 .
- Les échantillons de l'huile essentielle sont dilués dans l'acétate d'éthyle à 10%.
- La température de l'injection étant de 250 °C.

II.1.6 Résultats et discussion de l'étude chimique

II.1.6.1 Taux d'humidité

Les expériences réalisées dans le but de déterminer le taux d'humidité ont confirmé le séchage total de la matière végétale (aiguille). En effet, nous n'avons récupéré aucune goutte d'eau suite à la manipulation.

II.1.6.2 Propriétés caractéristiques de l'huile essentielle et des extraits lipidiques du *Pin noir*

L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle ou de l'extrait. L'analyse a été effectuée en observant et en inhalant directement l'huile essentielle ou l'extrait.

Dans cette étude, trois paramètres sont considérés pour évaluer la qualité organoleptique de l'huile essentielle ou de l'extrait :

- L'odeur
- La couleur
- L'aspect

Les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et des extraits lipidiques de *Pin noir* sont regroupées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et des extraits du Pin noir

	Aspect	Couleur	Odeur
Huile essentielle de <i>Pin noir</i>	Liquide légèrement visqueux	jaune claire	Forte odeur caractéristique
Extrait dans le MeOH	Liquide visqueux	Vert foncé	Forte odeur caractéristique
Extrait dans le MeOH/CHCl ₃	Liquide visqueux	Vert foncé	Forte odeur caractéristique
Extrait dans l'hexane	Liquide visqueux	Vert claire	Forte odeur caractéristique

II.1.6.3 rendement en huile essentielle et extrait lipidique

Le rendement moyen en huile essentielle obtenu est de $4,78 \cdot 10^{-3}$ %. Cette valeur est trop faible par rapport à la moyenne obtenue pour la plupart des huiles essentielles et qui est de l'ordre de 0,84%. Ceci est peut être du à différents facteurs comme :

- ❖ L'origine de la matière végétale.
- ❖ La région de récolte et la nature du sol.
- ❖ Le temps de récolte et durée de séchage de la matière végétale.
- ❖ Le mode et durée d'extraction de l'huile essentielle.

Concernant les extraits lipidiques, les rendements obtenus sont plus élevés que celle de l'HE. Les rendements des extraits de *Pin noir* sont :

- Méthanol : 0,33%.
- Méthanol/ CHCl_3 : 0,58%
- Hexane : 0,26%.

II.1.6.4 Analyse de l'huile essentielle de *Pin noir* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Le profil chromatographique de l'huile essentielle de *Pin noir* analysée par CG/SM est donné par la figure 11.

L'examen du chromatogramme (figure 11) révèle une composition chimique très complexe. Nous nous sommes intéressés à l'identification des principaux constituants de l'huile essentielle (tableau 3).

Tableau 3 : Produits identifiés dans l'huile essentielle du *Pin noir* par CG/SM

Ordre d'éluion	Composés	Formule chimique	Temps de rétention (mn)
1	D-Limonène	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	5,28
2	β -Phellandrene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	5,34
3	β -cis-Ocimene	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	5,46
4	α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$	6,07
5	p-Menth-1-en-8-ol	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$	9,16
6	Anisole, 2-isopropyl-5-methyl	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}$	9,85
7	Acétate de bornyle	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_2$	11,28
8	Eugenol	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	13,14

9	Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	14,77
10	α -Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	15,65
11	Cadina-3,9-diene	$C_{15}H_{24}$	16,37
12	oxyde de caryophyllene	$C_{15}H_{24}O$	18,82
13	Guaiol	$C_{15}H_{26}O$	19,13
14	Selina-6-en-4-ol	$C_{15}H_{26}O$	19,81
15	τ -Eudesmol	$C_{15}H_{26}O$	19,94
16	τ -Eudesmol	$C_{15}H_{26}O$	20,50
17	Hexadecanal	$C_{16}H_{32}O$	21,59
18	(7Z,10Z, 13Z)-7, 10, 13-Hexadecatrienal	$C_{16}H_{26}O$	25,39
19	Labd-14-ene-8, 13-diol, (13R)	$C_{20}H_{36}O_2$	30,46
20	Pimara-7, 15-dien-3-one	$C_{20}H_{30}O$	31,96

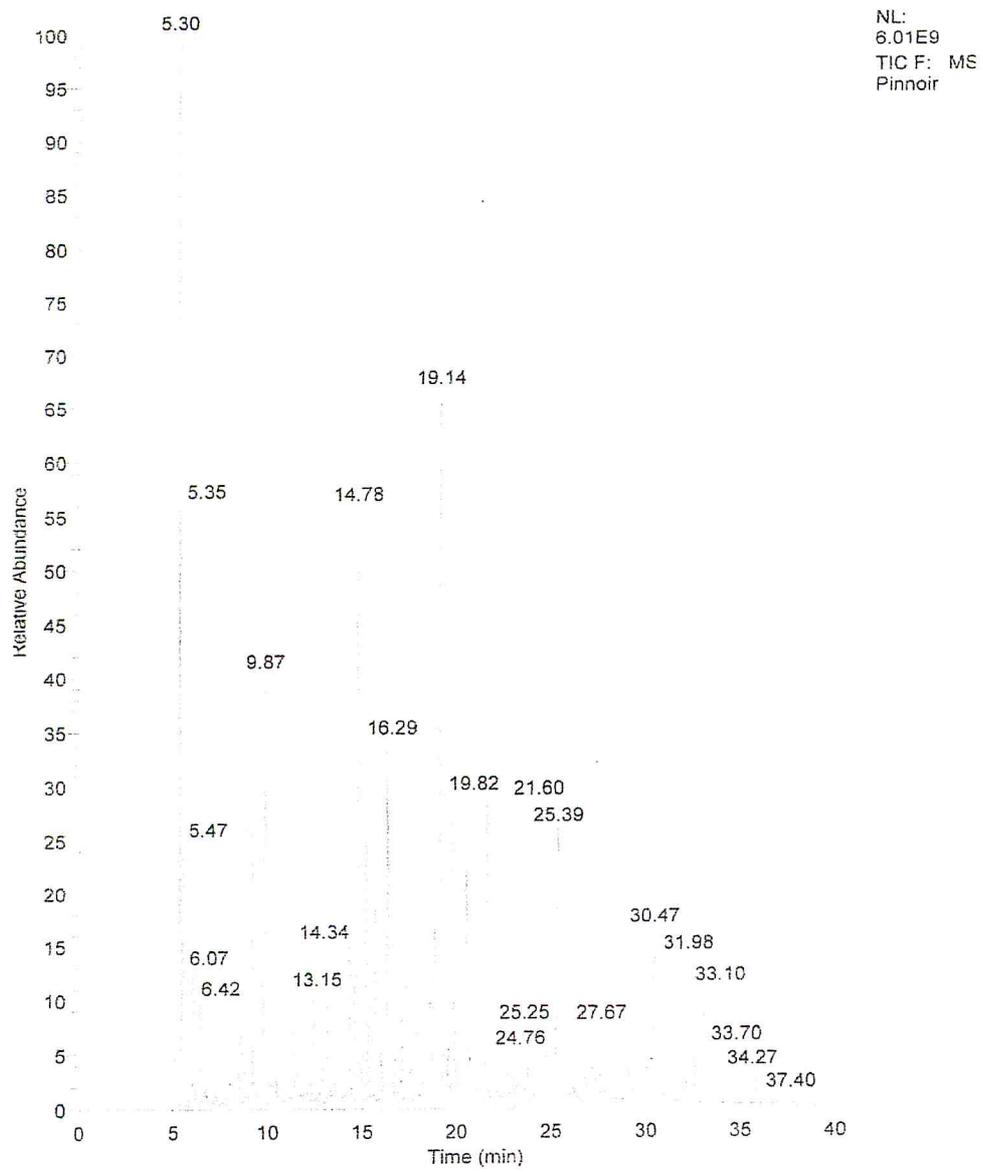


Figure 11 : Profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle du *Pin noir*

II.1.6.4.1 Discussion de la composition chimique de l'huile essentielle du *Pin noir*

La composition chimique est dominée par des composés de nature terpénique appartenant à la classe des monoterpènes et des sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés.

Dans la classe des monoterpènes, nous avons noté la présence du limonène, β -phellandrene, β -ocimène, P-menth-1-en-8-ol, le principal produit dans cette classe est le limonène.

La classe des sesquiterpènes est caractérisée par la présence du caryophyllene, guaiol, cadina-3,9-diene, oxyde de caryophyllene, selina-6-en-4-ol, α -caryophyllene...etc, les principaux sesquiterpènes dans cette composition sont : le caryophyllene et le guaiol.

L'examen des données de la littérature [5, 6, 13, 28, 30, 31] montre une composition chimique du *Pin noir* dominée par la présence du α -pinène ou l'oxyde de manoyl (en alternance).

L'huile essentielle objet de notre travail renferme des composés appartenant à la classe des terpènes, avec une absence totale de l' α -pinène et de l'oxyde de manoyl. L'absence de ces deux composés peut être liée à des considérations biosynthétiques ou des dégradations qui sont survenues au cours de l'hydrodistillation.

Notons aussi que l'huile essentielle des différentes régions compte aussi des composés communs tels que le limonène et l'acétate de bornyle.

Cette variation dans la composition de l'huile essentielle est due probablement aux lieux et aux périodes de récolte, aux sous espèces qui doivent être différentes.

II.2 Etude de l'activité antimicrobienne

Cette partie consiste à mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits lipidiques du *Pin noir* à l'aide d'une méthode qualitative, en procédant à des tests sur une sélection de souches de références bactérienne et fongique connues et qualifiées comme étant dangereuses et pathogènes pour l'homme et l'animal.

II.2.1 Tests d'activités antimicrobiennes

II.2.1.1 lieu de travail

Notre travail a été réalisé au niveau de l'unité bactériologique du laboratoire centrale (CHU) de l'hôpital Frantz Fanon et du centre hospitalo-universitaire Ben Boulaid de Blida.

II.2.1.2 Matériel microbien

Des souches bactériennes et fongiques de références (ATCC) ont été utilisées durant notre étude.

Les souches de références sont fournies par le laboratoire d'antibiothérapie et d'hygiène de l'institut Pasteur d'Alger agréé par l'OMS (Tableau 4).

Tableau 4 : Les souches de références utilisées dans notre étude

Souches	Gram	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC 27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	ATCC 51299
<i>Bacillus subtilis</i>	+	ATCC 663
<i>Sarcina</i>	+	ATCC 43300
<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231

II.2.1.2.1 Milieux de cultures

Les milieux de cultures utilisées au cours de la réalisation de ce travail sont :

- ◆ Gélose nutritive comme milieu de culture pour les bactéries.
- ◆ Milieu Sabouraud-chloramphénicol comme milieu de culture pour les levures.
- ◆ Milieu de Muller Hinton.

II.2.2 Etude qualitative de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits lipidiques par la méthode de diffusion sur milieu solide «Méthode de Vincent»

II.2.2.1 Principe

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des extraits lipidiques de *Pin noir*, en les mettant en présence des germes testés.

Des disques absorbants stériles sont imprégnés d'une quantité d'huile essentielle ou d'extrait et déposés sur une gélose inoculée avec les souches testées. La diffusion de cette huile essentielle ou des extraits lipidiques dans la gélose va permettre l'inhibition de la croissance des germes tout au tour des disques, dans le cas d'une éventuelle activité antimicrobienne positive, qui se traduira par une auréole claire et distincte autour du disque appelé : halo ou zone d'inhibition.

La lecture des résultats après incubation est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues pour chacune des souches.

La méthode est validée par la fascicule de Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS, fournis par NCCLS (National Committee for

Clinical Laboratory Standards). Son principe est tiré du titrage des antibiotiques (test d'antibiogramme).

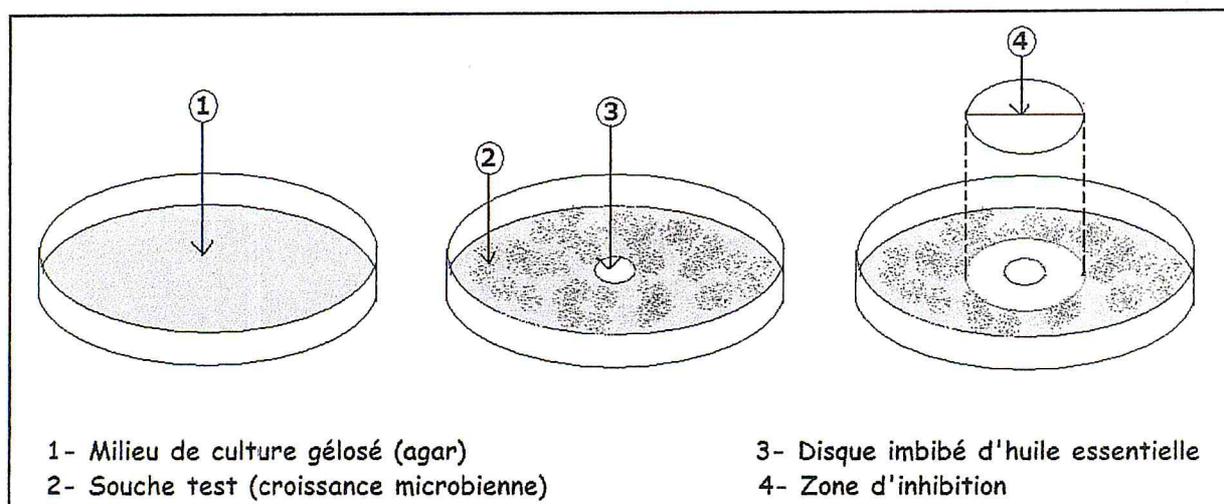


Figure 12 : Illustration de la méthode des antibiogrammes

II.2.2.2 Technique

La méthode que nous avons utilisée est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé par NCCLS et recommandé par l'OMS.

Milieu

- Gélose Muller-Hinton (MH) (bactéries non exigeantes) ; coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4 mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être à 0,5 Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Dépôts des disques

- A l'aide d'une pince stérile, prélever à chaque fois un disque stérile de 09 mm de diamètre. Ce dernier est imbibé avec l'huile essentielle ou bien avec les extraits de Pin noir qu'on veut tester, en mettant seulement en contact le bout du disque, ceux-ci vont être absorbés progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque.
- Déposer les disques sur la surface de la gélose.
- Laisser diffuser sur paillasse pendant 30 min.

Incubation

- 24 heures à 37°C pour les bactéries.
- 48 heures à 25°C pour les levures.

Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques des ATCC.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensibles, Intermédiaire ou Résistante.

Remarque : A cause de la petite quantité qu'on avait de l'huile essentielle de *Pin noir*, nous avons procédé à une dilution de notre huile essentielle dans le méthanol à une concentration de 150mg/ml, de même, les extraits ont été dilués dans le méthanol dans les proportions suivantes :

- extrait obtenu avec du méthanol : 150 mg/ml.
- extrait obtenu avec du méthanol/chloroforme : 300 mg/ml.
- extrait obtenu avec de l'hexane 200 mg/ml.

II.2.3 Résultats et discussion des tests d'activités antibactérienne et antifongique

II.2.3.1 Résultats obtenus

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle et des extraits lipidiques du *Pin noir* ont été effectuées par la méthode de disque absorbant ou méthode de diffusion sur la gélose «Méthode de Vincent».

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et des extraits lipidiques est évaluée en fonction du diamètre (mm ou cm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne [31].

L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est basée sur une échelle de mesure mise en place par Meena et al. (1994) [32], le pouvoir antimicrobien est classé en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 04 classes :

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieure à 28 mm.
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 16 et 28 mm.
- Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10 et 16 mm.
- Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieure à 10 mm.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des aiguilles du Pin noir par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes sont donnés dans le tableau 5.

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits du Pin noir par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes sont donnés dans le tableau 6, 7, 8.

Tableau 5 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle sur les souches de références

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	Résistante
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Résistante
<i>Bacillus subtilis</i>	+	17
<i>Sarcina</i>	+	14
<i>Candida albicans</i>		15

Tableau 6 : Activité antimicrobienne de l'extrait de *Pin noir* dans le MeOH sur les souches de références

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	Résistante
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Résistante
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Résistante
<i>Bacillus subtilis</i>	+	16
<i>Sarcina</i>	+	15
<i>Candida albicans</i>		Résistante

Tableau 7 : Activité antimicrobienne de l'extrait de *Pin noir* dans le MeOH/chloroforme sur les souches de références

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	Résistante
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Résistante
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Résistante
<i>Bacillus subtilis</i>	+	11
<i>Sarcina</i>	+	13
<i>Candida albicans</i>		Résistante

Tableau 8 : Activité antimicrobienne de l'extrait de *Pin noir* dans l'hexane sur les souches de références

Souches	Gram	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Résistante
<i>Bacillus subtilis</i>	+	12
<i>Sarcina</i>	+	17
<i>Candida albicans</i>		Résistante

Les résultats qualitatifs du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle et des extraits lipidiques du *Pin noir* sur les souches de références étudiées sont présentés dans les figures (13, 14, 15, 16, 17, 18).

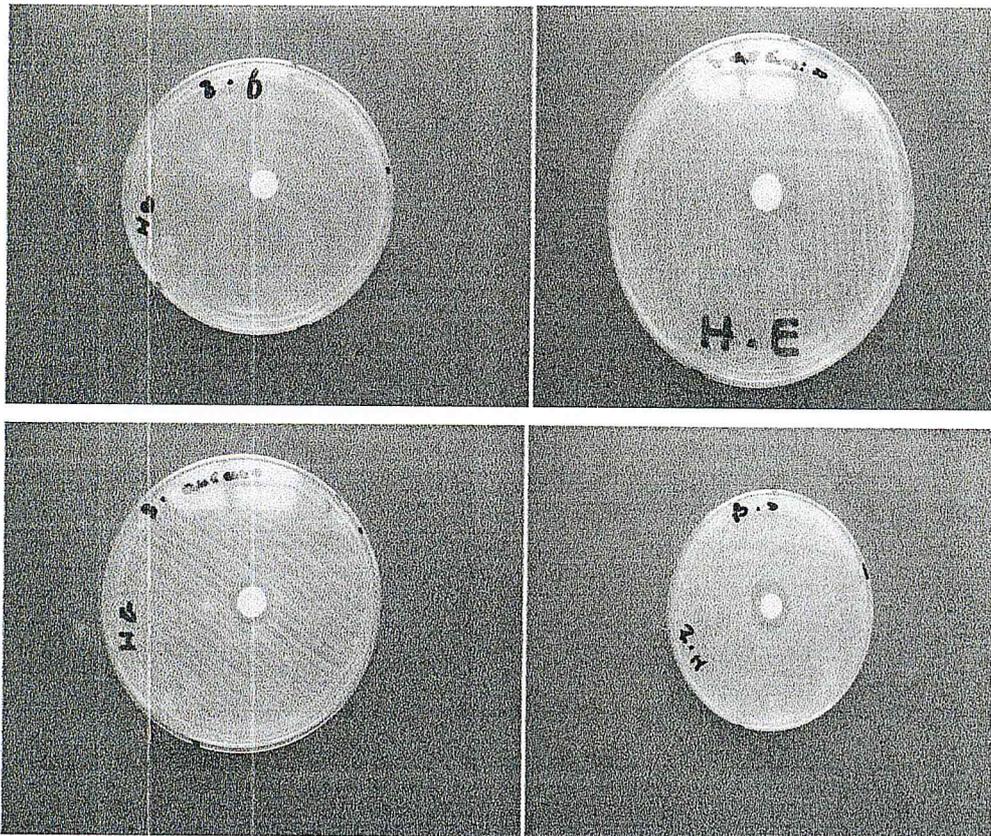


Figure 13 : Aromatogrammes des bactéries à Gram positif testées avec l'huile essentielle du *Pin noir*

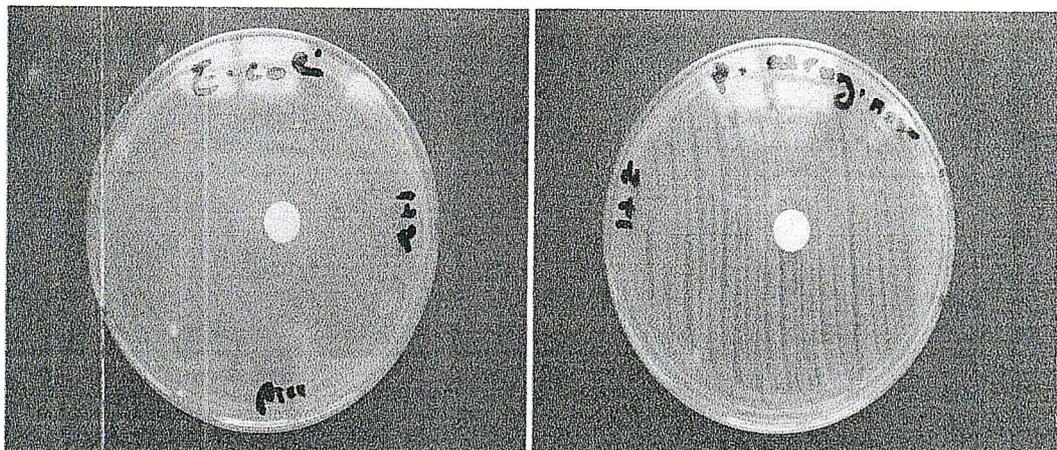


Figure 14 : Aromatogrammes des bactéries à Gram négatif testées avec l'huile essentielle du *Pin noir*

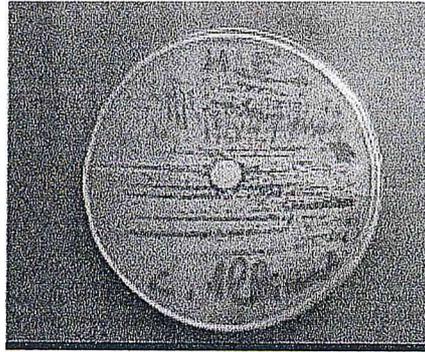


Figure 15 : Aromatogramme du *C. albicans* testé avec l'huile essentielle du *Pin noir*

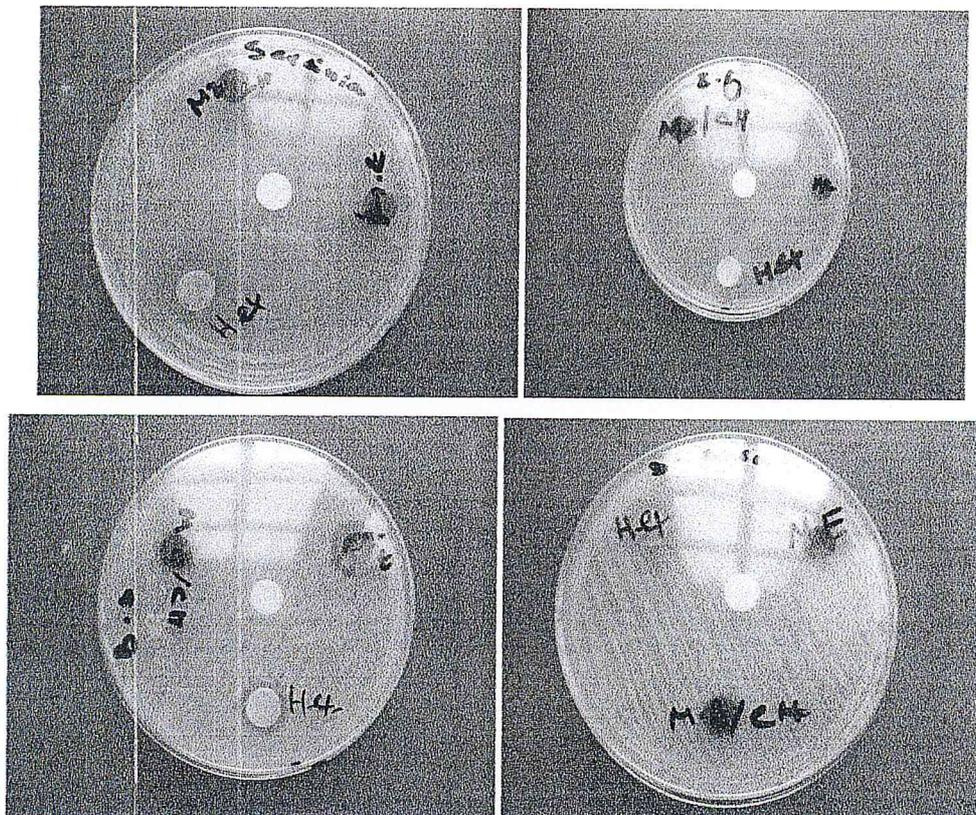


Figure 16 : Aromatogrammes des bactéries à Gram positif testées avec les extraits du *Pin noir* (dans : méthanol, méthanol/chloroforme, l'hexane)

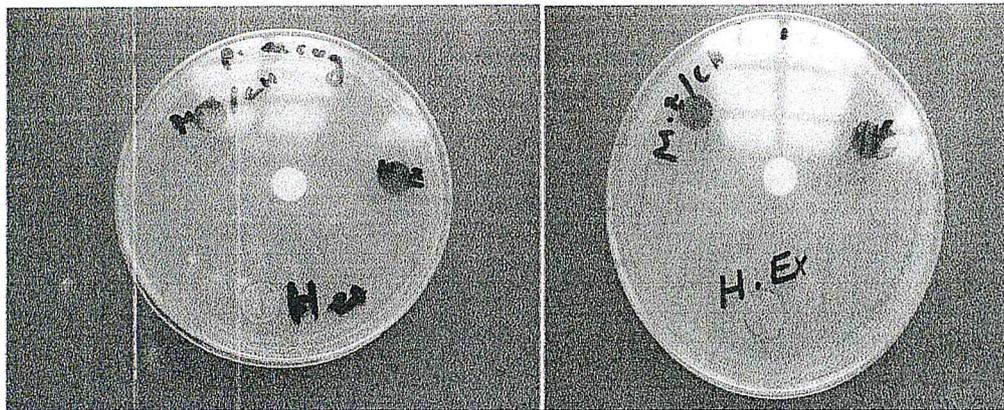


Figure 17 : Aromatogrammes des bactéries à Gram négatif testées avec les extraits du *Pin noir* (dans : méthanol, méthanol/chloroforme, l'hexane)

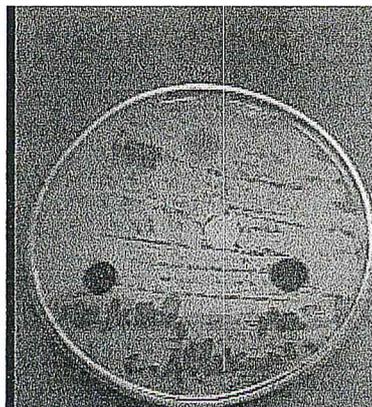


Figure 18 : Aromatogramme du *C. albicans* testé avec les extraits du *Pin noir* (dans : méthanol, méthanol/chloroforme, l'hexane)

II.2.3.2 Discussion des résultats

On constate un effet inhibiteur de l'huile essentielle sur le développement de certaines souches de bactéries et de levure. On remarque également qu'elle est inactive envers *E. coli* et *E. faecalis*. De ce fait, on peut conclure que l'huile essentielle exerce une très faible activité bactéricide et fongicide.

Les extraits de *Pin noir* dans le méthanol et dans méthanol/chloroforme montrent une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif tandis que les bactéries à Gram négatif se sont montrées résistantes envers ces deux extraits.

Les trois extraits lipidiques n'ont pas une activité antifongique envers *C. albicans* ni bactéricide vis-à-vis *E. faecalis*.

Remarque : nous avons noté une activité antibactérienne très faible de l'huile essentielle et des extraits lipidiques à une concentration de 100 mg/ml (dilution dans le méthanol) sur les quatre souches : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*.

CONCLUSION

Conclusion

Notre travail a porté sur l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pin noir* ainsi qu'à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de ses extraits lipidiques (méthanol, méthanol/chloroforme, hexane).

L'extraction de l'huile essentielle de *Pin noir* a été effectuée par hydrodistillation, en utilisant un clevenger, elle a mené à un rendement très faible de $4,78 \cdot 10^{-3}\%$. Cette valeur est assez faible comparativement à d'autres huiles essentielles. Les extraits lipidiques ont été préparés par macération avec des rendements de : 0,33% (dans méthanol), 0,58% (dans méthanol/chloroforme) et 0,26% (dans l'hexane).

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) a permis la séparation et l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pin noir*. Cette dernière est constituée principalement de : D-Limonene, β -Phellandrene, β -cis-Ocimene, α -Methyl- α -[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol, p-Menth-1-en-8-ol, Anisole, 2-isopropyl-5-methyl, Acetate de bornyle, Eugenol, Caryophyllene, α -Caryophyllene, Cadina-3,9-diene, oxyde de caryophyllene, Guaiol, Selina-6-en-4-ol, τ -Eudesmol, Hexadecanal, (7Z,10Z,13Z)-7,10,13-Hexadecatrienal, Pimara-7,15-dien-3-one, Labd-14-ene-8,13-diol, (13R).

Les tests d'activités antibactériens effectués sur l'huile essentielle de *Pin noir* et les trois extraits (méthanol, méthanol/chloroforme, hexane) ont montré, pour certains d'entre eux, des actions inhibitrices vis-à-vis de certaines souches telles que « *Sarcina* ». Par contre, la bactérie *E.faecalis* s'est révélée assez résistante.

En vue de la valorisation de ces espèces, il convient d'envisager une étude plus approfondie, tel que l'étude saisonnière et géographique et leur influence sur sa diversité chimique. Également, on peut envisager l'étude chimique des extraits lipidiques afin d'isoler des structures originales, éventuellement bioactives ainsi qu'on peut élargir le domaine d'étude (augmenter le nombre de souches) et de tester l'activité antimicrobienne à différentes concentrations.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Zorica. S, Jelena S. M, Zorica Z. Stojanovic-Radic, Jovana B. V, A. M. Dzamic, S. Bojovic, P. D. Marin, «Biological activity of *Pinus nigra* terpenes-evaluation of ftsz inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity», Journal of Computers in Biology and Medicine, 54, 1-7, (2014).
- [2] S. Rezzi, A. Bighelli, V. Castola, J. Casanova, «Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp. Laricio from Corsica», Journal of Industrial crops and products, 21, 71-79, (2005).
- [3] Nian-Yun. Yang, Li. Liu, Wei-Wei. Tao, Jin-Ao. Duan, Li-Juan. Tian, «Diterpenoids from *Pinus massoniana* resin and their cytotoxicity against A431 and A549 cells», Journal of Phytochemistry, 71, 1528-1533, (2010).
- [4] L. Cutillas-Barreiro, L. Ansias-Manso, D. Fernandez-Calvino, M. Arias-Estevez, J. C. Novoa-Munoz, M. J. Fernandez-Sanjurjo, E. Alvarez-Rodriguez, A. Nunez-Delgado, «Pine bark as bio-adsorbent for Cd, Cu, Ni, Pb and Zn : Batch-type and stirred flow chamber experiments», Journal of Environmental management, 144, 258-264, (2014).
- [5] I. Tumen, H. Hafizoglu, A. Kilic, I. E. Donmez, H. Sivrikaya and M. Reunanen, «Yields and constituents of essential oil from cones of *Pinaceae* spp. Natively grown in turkey», Molecules, 15, 5797-5806, (2010).
- [6] O. Ustun, F.S. Senol, M. Kurkcuglu, L. E. Orhan, M. Kartal, K. H. C. Baser, « Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol», Journal of Industrial crops and products, 38, 115-123, (2012).
- [7] J. Tardif, «Une visite au jardin Roger-Vanden. Hende : un parcours de l'évolution des végétaux, éditeurs : Editions MultiMondes», 157 p, Sainte-Foy Québec, (2003).
- [8] Philippe-Riou-Nivert, «Les résineux : tome 1, éditeur : foret privée française», 447 p, Paris, (2005).
- [9] J. C. Rameau, G. Dume, «Flore forestière Française : plaines et collines, volume 1, éditeurs : foret privée française», 1785 p, France, (2008).
- [10] S. P. Bhatnagar, A. Moitra, «Gymnosperms, édition : réimprimée, éditeur : New Age international», 467 p, New Delhi Inde, (1996).
- [11] E. Sezik, O. Ustum, B. Demirci, K.H. C. Baser, «Composition of essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey», Journal of Turk J Chem, 34, 313-325, (2010).
- [12] F. Macchioni, P.L.Cioni, G. Flamini, L. Morelli, S. Maccioni and M. Ansaldi, «Chemical composition of essential oil from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halpensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy», Journal of Flavour and Fragrance, 18, 139-143, (2003).

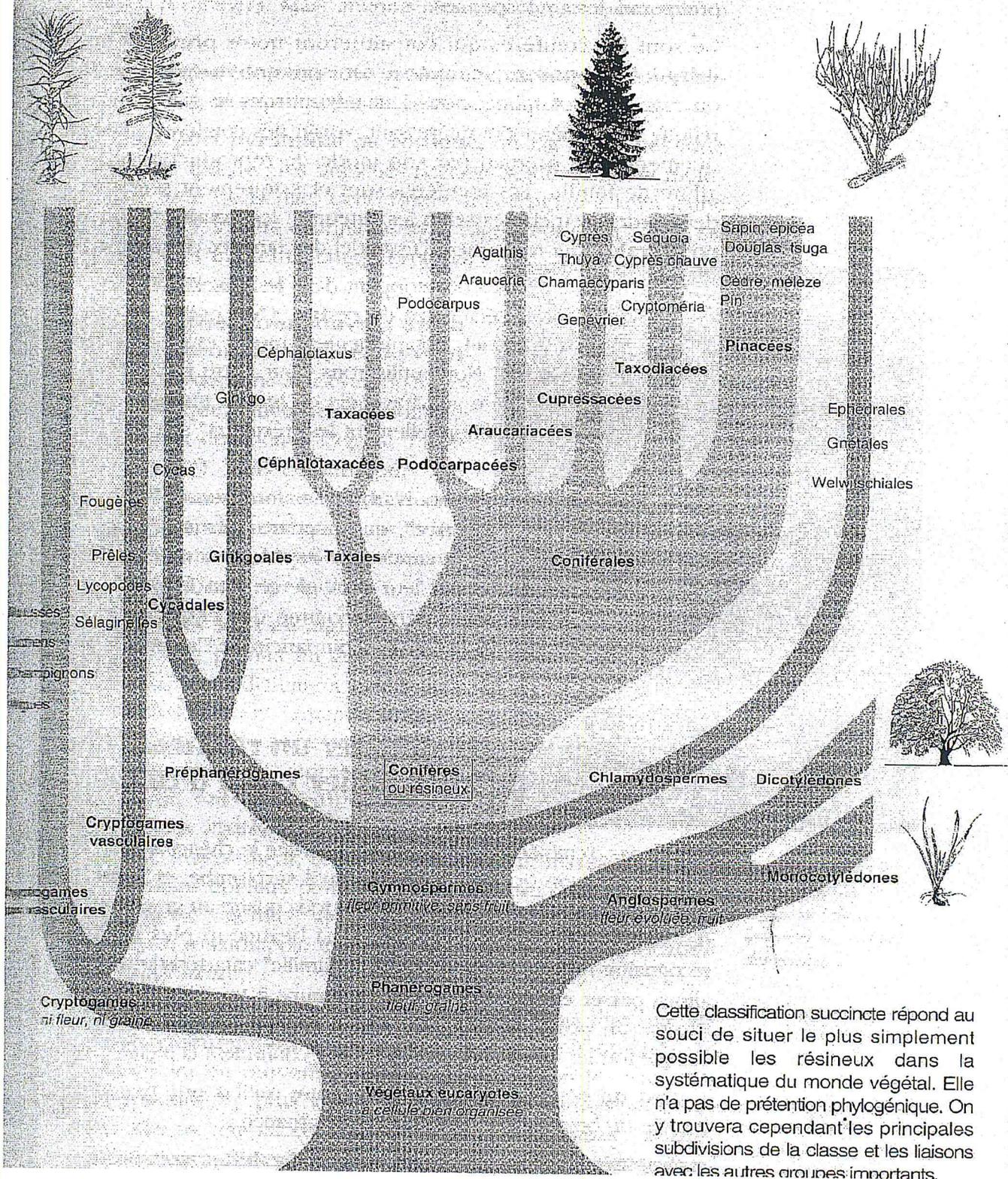
- [13] Z. Sarac, S. Bojovic, B. Nikolic, V. Tesevic, I. Dordevic and P. D. Marin, «Chemotaxonomic significance of the terpene composition in natural populations of *Pinus nigra* J. F. Arnold from Serbia», *Journal of Chemistry and Biodiversity*, 10, 1507-1520, (2013).
- [14] S. Rezzi, A. Bighelli, D. Mouillot and J. Casanova, «Composition and chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *Laricio* from Corsica», *Journal of Flavour and Fragrance*, 16, 379-383, (2001).
- [15] C. Klaas, A. W. Gerd, L. Stefan, S. Silvio, L. R. Della, B. Ulrich, P. Heike. L et M. Irmgard, «Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from arnica flowers», *Journal of Planta Medica*, 68 (5), 385-391, (2002).
- [16] L. Claude, «Les lipides dans le monde vivant, éditeur : Lavoisier», 308 p, Paris, (2010).
- [17] E. M. H. P. Mateus, «Caractérisation de *Pinus* spp. Needles by gaz chromatography and mass spectrometry : application to plant insect interactions», thèse de Doctorat, University de Nova de Lisboa, (2009).
- [18] J. L. Goldstein, M. S. Brown, «Regulation of the mevalonate pathway», *Nature*, 343, 425-430, (1990).
- [19] N. Qureshi, J. W. Porter, «In biosynthesis of isoprenoid compounds, éditeur : Porter J W, Spurgeon S L, Vol. 1», 47-94 p, New York, (1981).
- [20] A. K. Chauhan, A. Varma, «A text book of molecular biotechnology, éditeur : IK International Pvt Ltd», 1354 p, New Delhi, (2009).
- [21] M. Piatelli, «Chemistry and taxonomy of Sicilian cystoseira species», *New. J. Chem*, 14, 777-782, (1990).
- [22] R. Valls, «Séparation, identification, étude spectroscopiques de métabolites secondaires d'algues brunes (cystoseiracées). Dosage. Variation. Chimiotaxonomie», thèse d'état, Université d'Aix Marseille III, (1993).
- [23] P. Georges, J. Legault, S. Lavoie, C. Grenon and A. Pichette, «Diterpenoids from the buds of *Pinus banksiana* lamb», *Molecules*, 17, 9716- 9727, (2012).
- [24] L. Buratti, J.P. Allais, C. Geri, M. Barbier, «Abietane and pimarane diterpene acid Evolution in scots *Pine Pinus sylvestris* needles in relation to feeding of the *Pine* sawfly , *diprion pini* L», *Annals of Forest Science*, 47, 161-171, (1990).
- [25] A. Kilic, «Extractives in the cones of *Pinus* species», *Journal of Wood Prod*, 69, 37-40, (2011).
- [26] M. Geraldo de Carvalho, Victor. Rumjanek. M, Maria de Jesus. Lopes. S, Acacio Geraldo de carvalho, «Diterpenes from *Pinus taeda*», *Journal of Phytochemistry*, 49, 1101-1105, (1998).

- [27] Mazaki, Himejima, K. R. Hobson, T. Otsuka, D. L. Wood et I. Kubo, «Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa *Pine* tree : a defense Mechanism against microbial invasion», *Journal of Chemical ecology*, 18, 1809-1818, (1992).
- [28] E. Duquesnoy, B. Marongiu, V. Castola, A. Piras, S. Porcedda, J. Casanova, «Supercritical CO₂ extract from needles of *Pinus nigra* ssp. Laricio : combined analysis by GC, GC-MS and ¹³C NMR», *Journal of Natural Product Research*, 21, 834-837, (2007).
- [29] O. Politeo, I. Botica, T. Bilusic, M. Jukic, I. Carev, F. Burcul and M. Milos, «Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp dalmatica (vis.) Franco», *Journal of Medecinal Plants Research*, 5(30), 6590-6596, (2011).
- [30] I. Amri, M. Hanana, B. Jamoussi, L. Hamrouni, «Essential oils of *Pinus nigra* J. F. Arnold subsp laricio Maire : chemical composition and study of their herbicidal potential», *Arabian Journal of chemistry*, 1-6, (2014).
- [31] Pharmacopée Européenne, direction de la qualité du médicament, council of Europe, 2623 pages, (2002).
- [32] M. M. R. Sethi. V, «Antimicrobial activity of the essential oils from spices», *Journal of Food Science and Technology Mysore*, 31, 68-70, (1994).

ANNEXES

ANNEXE 1

PLACE DES RÉSINEUX DANS LE RÈGNE VÉGÉTAL



Cette classification succincte répond au souci de situer le plus simplement possible les résineux dans la systématique du monde végétal. Elle n'a pas de prétention phylogénique. On y trouvera cependant les principales subdivisions de la classe et les liaisons avec les autres groupes importants.

ANNEXE 2

Composition des milieux de cultures

Gélose Muller Hinton

Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon de maïs	15g
Agar.....	13g
Eau distillée.....	1L

pH = 7,4

Sabouraud

Peptone de caséine	5g
Peptone de viande	5g
Glucose.....	40g
Agar	15g
Eau distillée	1L

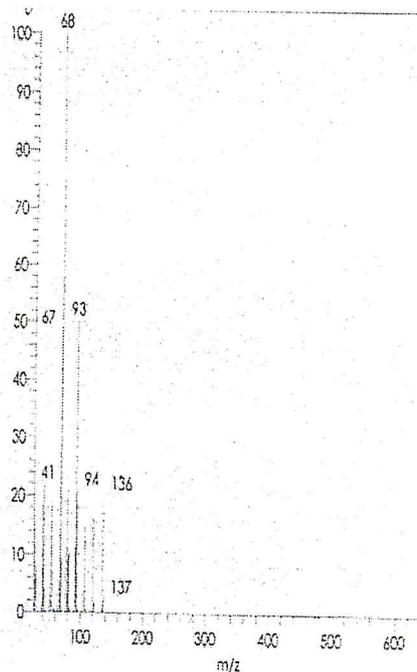
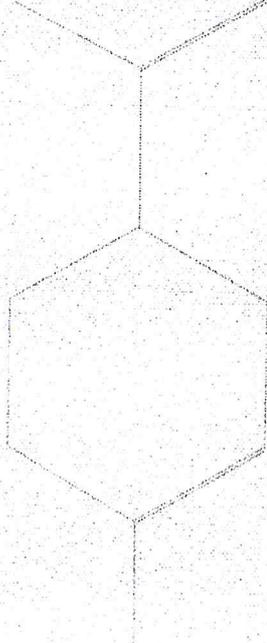
pH = 5,6

ANNEXE 3

Chromatogrammes des composés de l'huile essentielle de *pin*

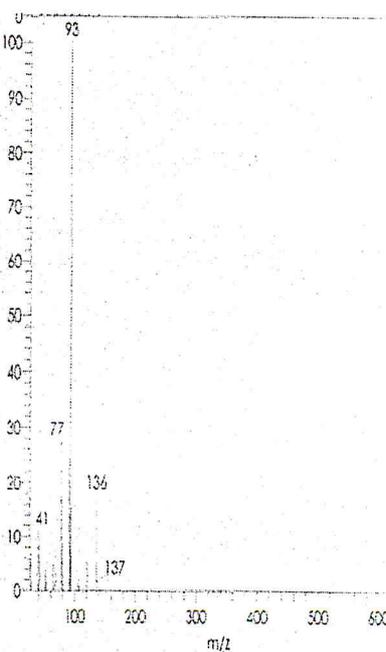
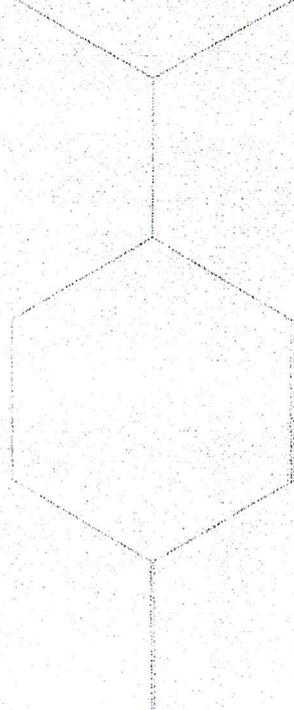
noir

D-Limonene
Formula C₁₀H₁₆, MW 136, CAS# 5989-27-5, Entry# 7415
Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (R)-

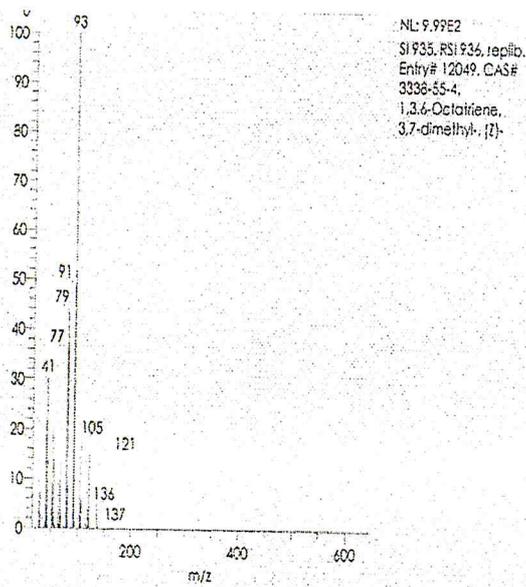


NL:
9.97E2
SI 910, RSI 910,
replib, Entry#
7415, CAS#
5989-27-5,
D-Limonene

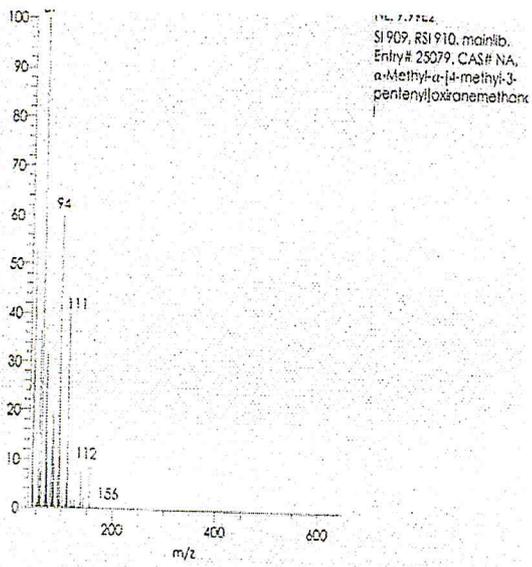
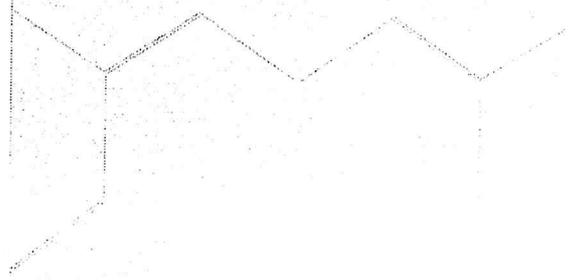
β -Phellandrene
Formula C₁₀H₁₆, MW 136, CAS# 555-10-2, Entry# 51488
Cyclohexene, 3-methylene-6-(1-methylethyl)-



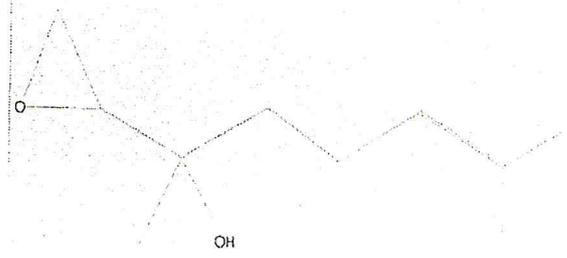
NL:
9.97E2
SI 942, RSI 952,
mainlib, Entry#
51488, CAS#
555-10-2,
 β -Phellandrene

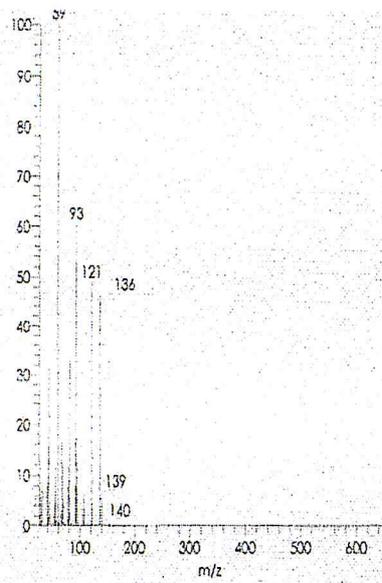


1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
 Formula C₁₀H₁₆, MW 136, CAS# 3338-55-4, Entry# 12049
 β-cis-Ocimene



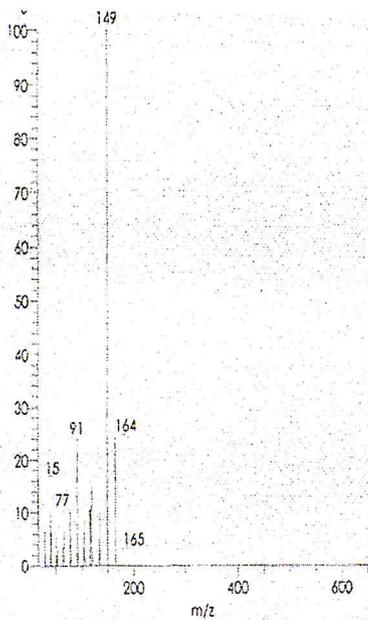
α-Methyl-α-[4-methyl-3-pentenyl]oxanemethanol
 Formula C₁₀H₁₈O₂, MW 170, CAS# NA, Entry# 25079





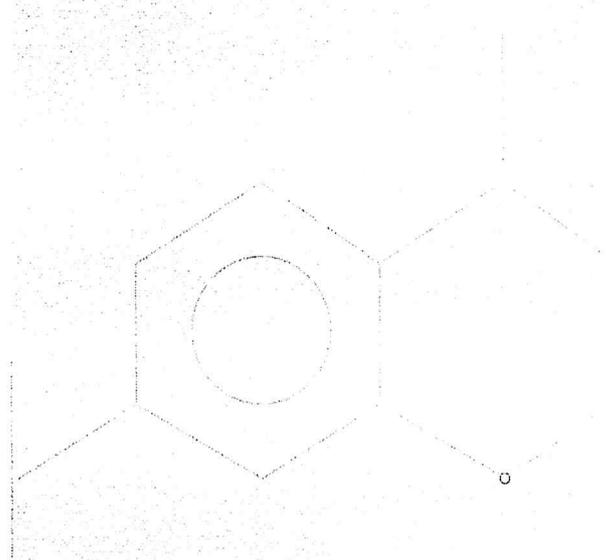
Si 913, RSI 916, replib,
 Entry# 6602, CAS#
 98-55-5,
 3-Cyclohexene-1-
 methanol, α,α -dimethyl-

3-Cyclohexene-1-methanol, α,α -dimethyl-
 Formula C₁₀H₁₈O, MW 154, CAS# 98-55-5, Entry# 6602
 p-Menth-1-en-8-ol

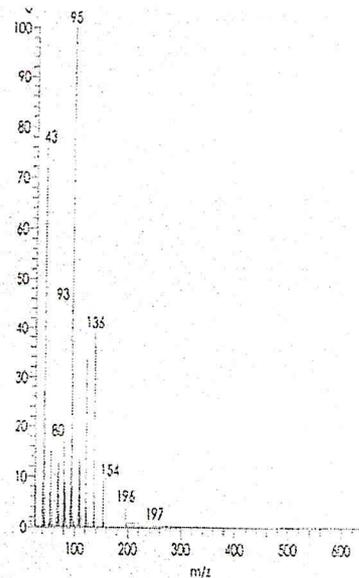
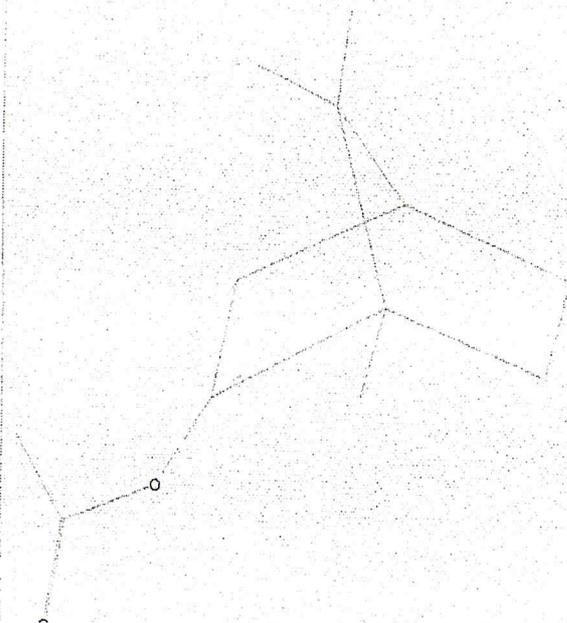


Si 932, RSI 963, mainlib,
 Entry# 96242, CAS#
 1076-56-8, Benzene,
 2-methoxy-4-methyl-1-(1-
 methyl-ethyl)-

Benzene, 2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-
 Formula C₁₁H₁₆O, MW 164, CAS# 1076-56-8, Entry# 96242
 Anisole, 2-isopropyl-5-methyl-

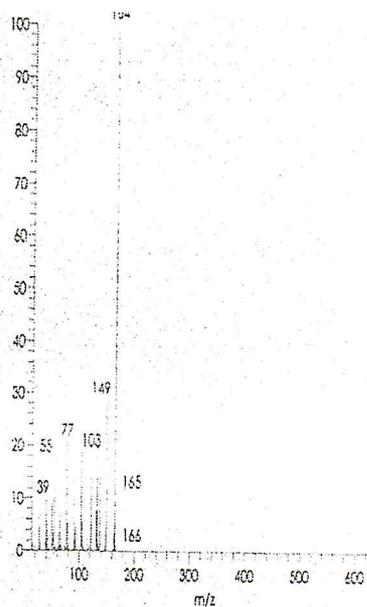
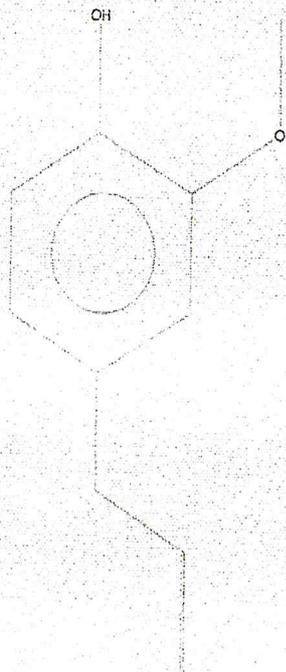


Bornyl acetate
Formula C₁₂H₂₀O₂, MW 196, CAS# 76-49-3, Entry# 52856
Bicyclo[2.2.1]heptan-2-yl, 1,7,7-trimethyl-, acetate, endo-

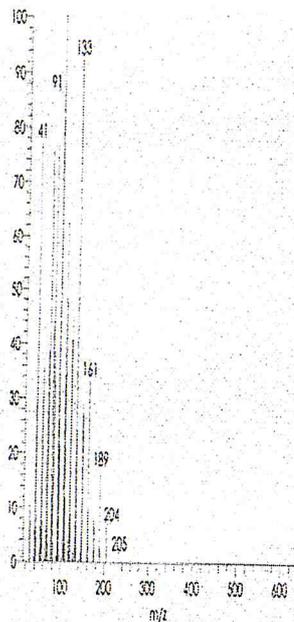


NL1
9.99E2
SI 927, RSI 931,
mainlib, Entry#
52856, CAS#
76-49-3, Bornyl
acetate

Eugenol
Formula C₁₀H₁₂O₂, MW 164, CAS# 97-53-0, Entry# 21231
Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-

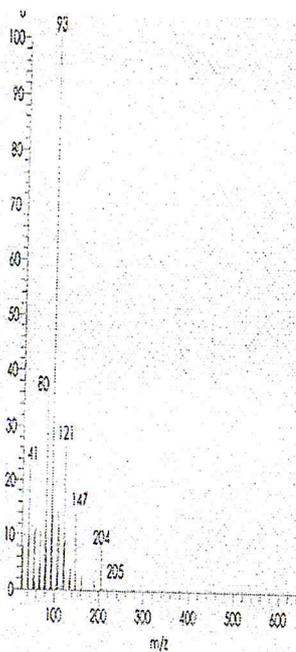
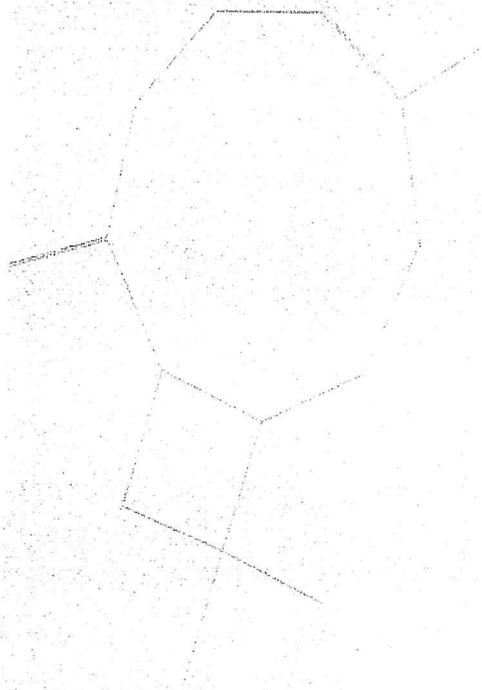


NL1
9.99E2
SI 925, RSI 926,
reflib, Entry#
21231, CAS#
97-53-0, Eugenol



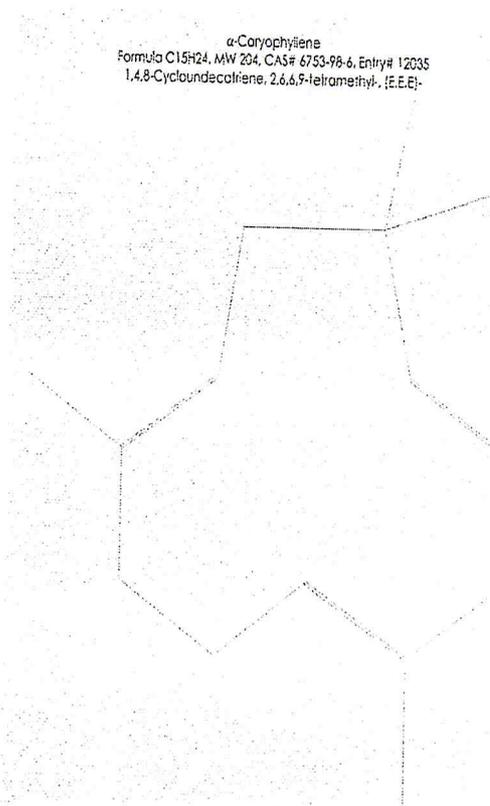
9.99E2
 SI 935, RSI 938,
 mainId, Entry#
 51899, CAS#
 87-44-5,
 Caryophyllene

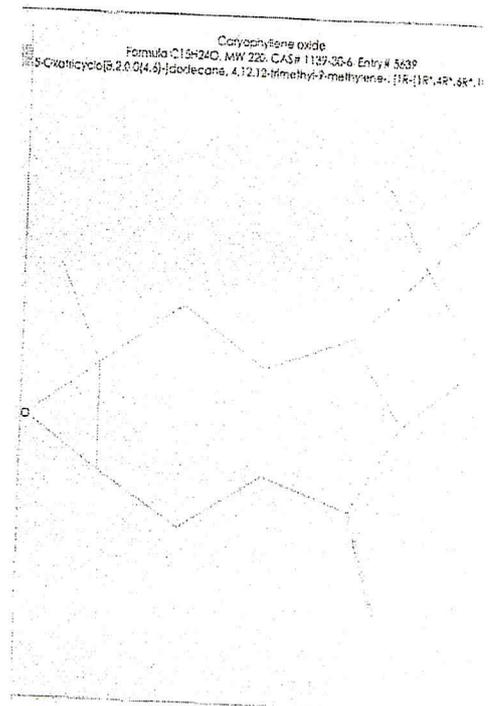
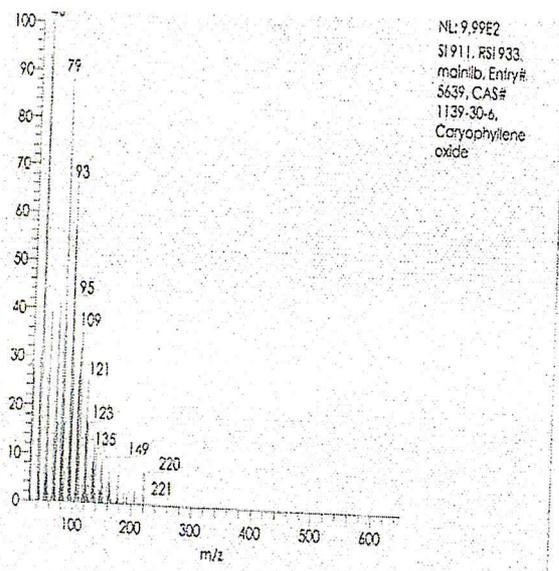
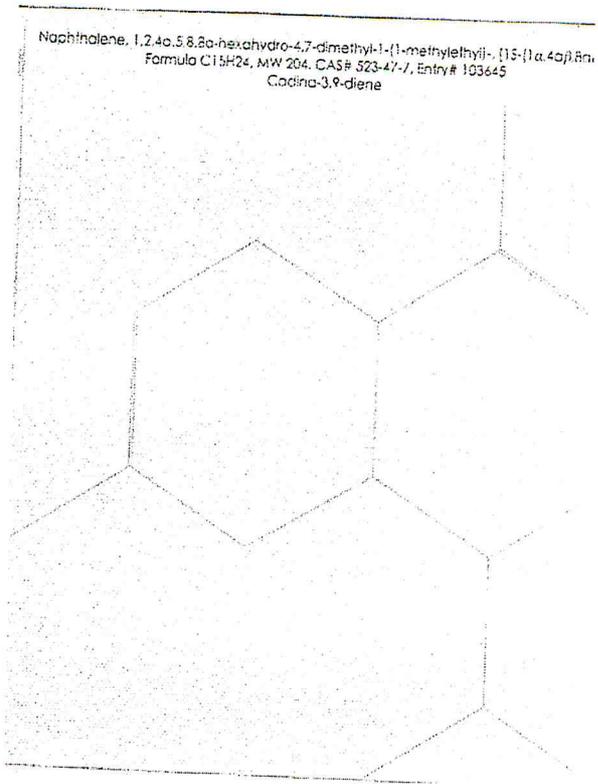
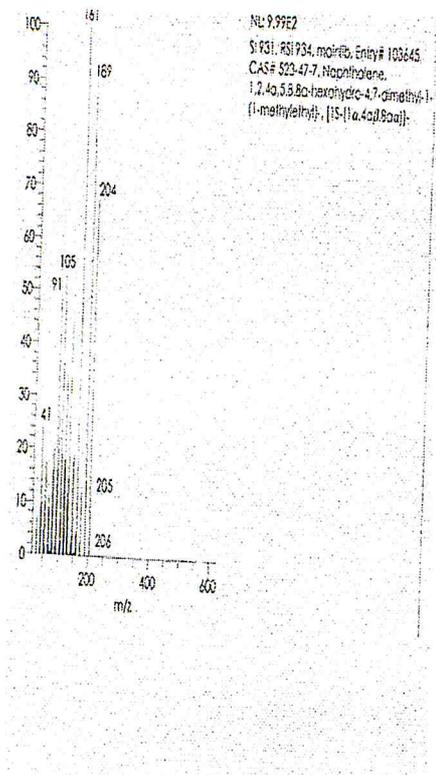
Caryophyllene
 Formula C15H24, MW 204, CAS# 87-44-5, Entry# 51899
 Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [(1R,4E,9S)-]



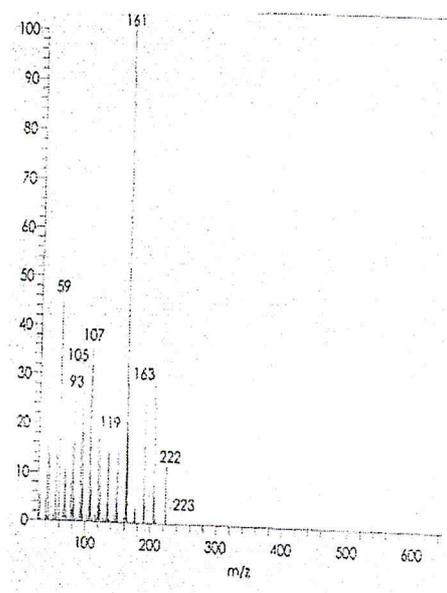
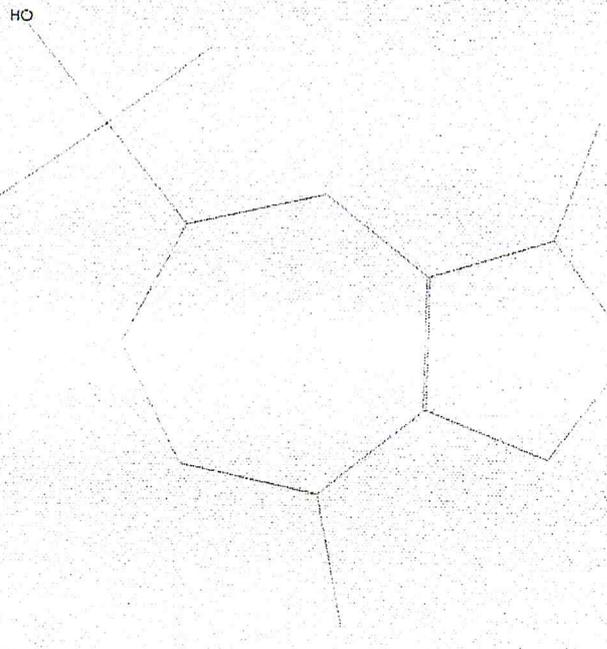
NI:
 9.99E2
 SI 917, RSI 932,
 repId, Entry#
 12035, CAS#
 6753-99-6,
 alpha-Caryophyllene

alpha-Caryophyllene
 Formula C15H24, MW 204, CAS# 6753-99-6, Entry# 12035
 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,8,9-tetramethyl-, [(E,E)-]



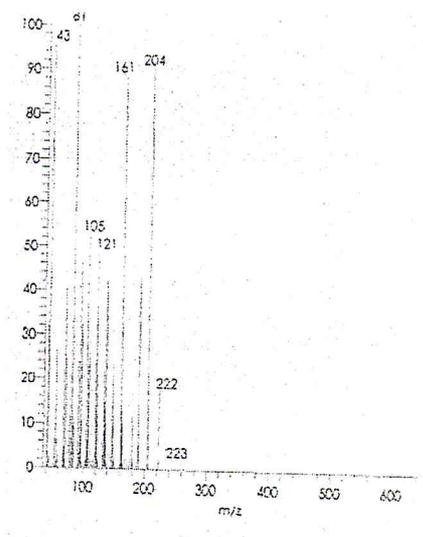
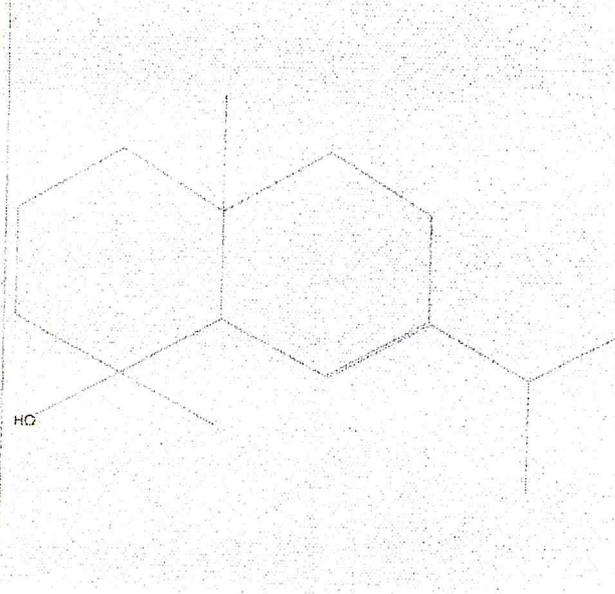


Guaiol
 Formula C₁₅H₂₆O, MW 222, CAS# 489-86-1, Entry# 103124
 5-Azulenemethanol, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro- $\alpha,\alpha,3,8$ -tetramethyl-, (3S-[3 $\alpha,5\alpha,8\alpha$])



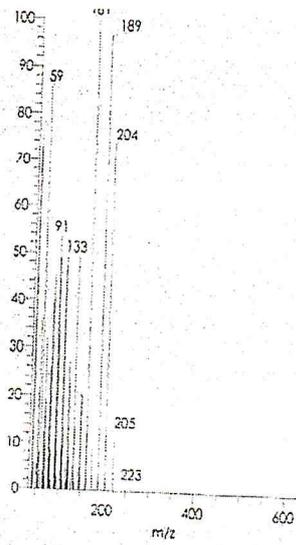
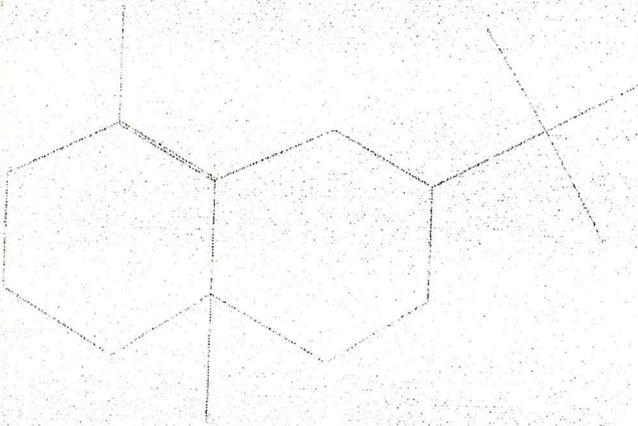
NL:
 9.99E2
 SI 936, RSI 935,
 mainlib, Entry#
 103124, CAS#
 489-86-1, Guaiol

Selina-6-en-4-ol
 Formula C₁₅H₂₆O, MW 222, CAS# NA, Entry# 39468



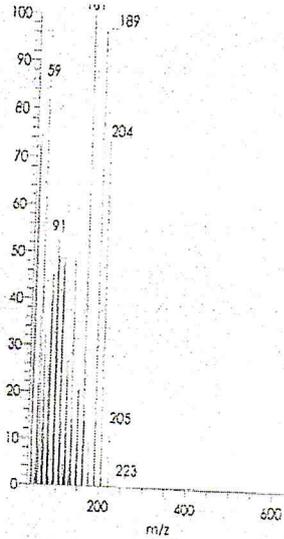
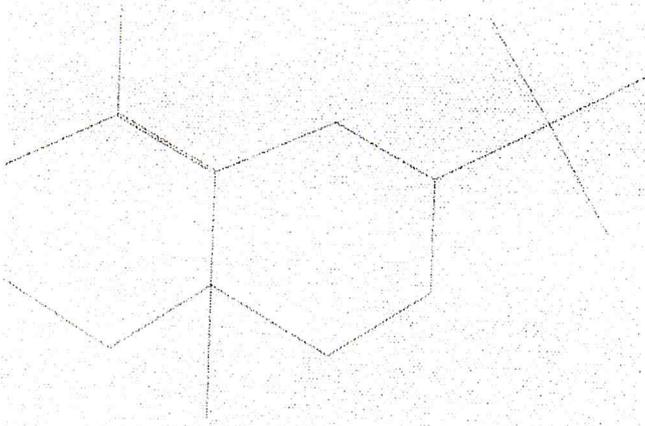
NL:
 9.99E2
 SI 892, RSI 907,
 mainlib, Entry#
 39468, CAS# NA,
 Selina-6-en-4-ol

2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro- $\alpha,\alpha,4a,8$ -tetramethyl-, (2R-cis)-
Formula C₁₅H₂₆O, MW 222, CAS# 1209-71-8, Entry# 20981
r-Eudesmol

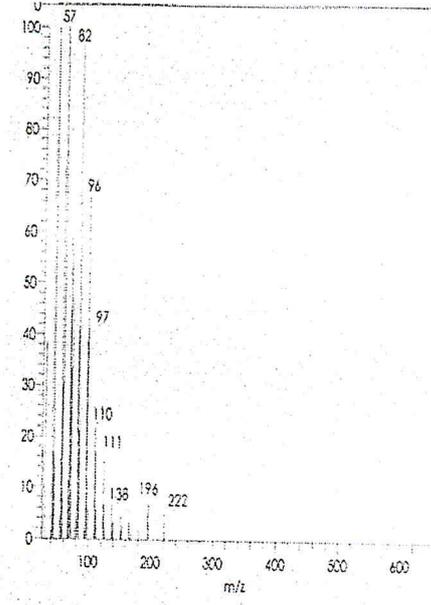
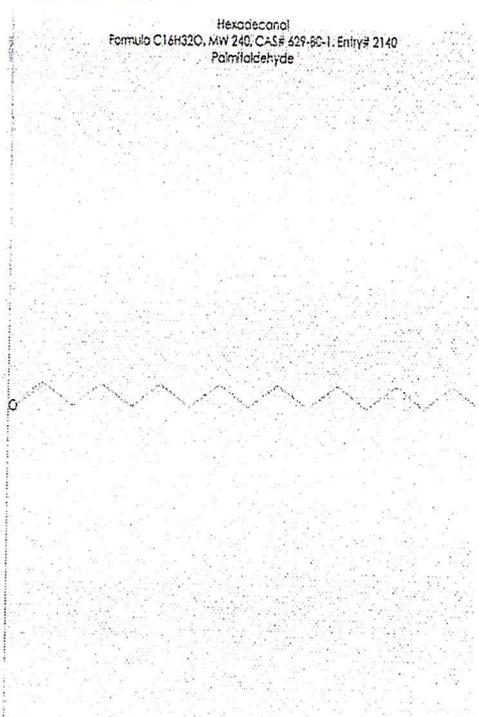


NL197YEZ
SI 907, RSI 939, replb, Entry# 20981,
CAS# 1209-71-8,
2-Naphthalenemethanol,
1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro- $\alpha,\alpha,4a,8$ -
tetramethyl-, (2R-cis)-

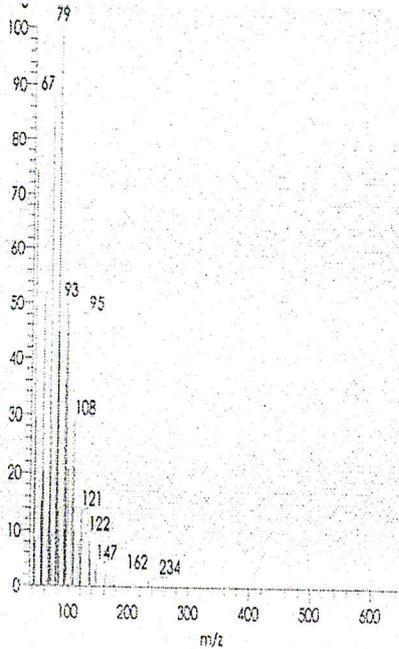
2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro- $\alpha,\alpha,4a,8$ -tetramethyl-, (2R-cis)-
Formula C₁₅H₂₆O, MW 222, CAS# 1209-71-8, Entry# 20981
r-Eudesmol



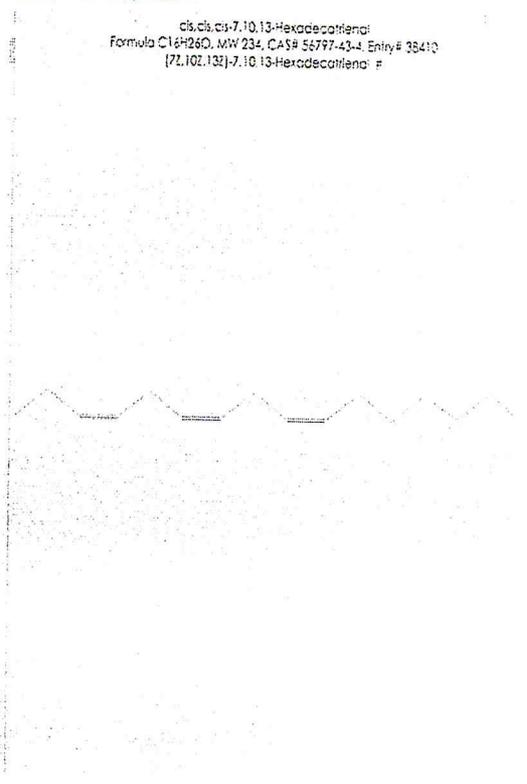
NL197YEZ
SI 886, RSI 909, replb, Entry# 20981,
CAS# 1209-71-8,
2-Naphthalenemethanol,
1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro- $\alpha,\alpha,4a,8$ -
tetramethyl-, (2R-cis)-



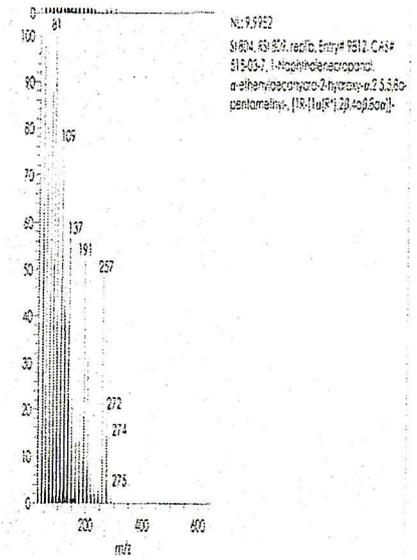
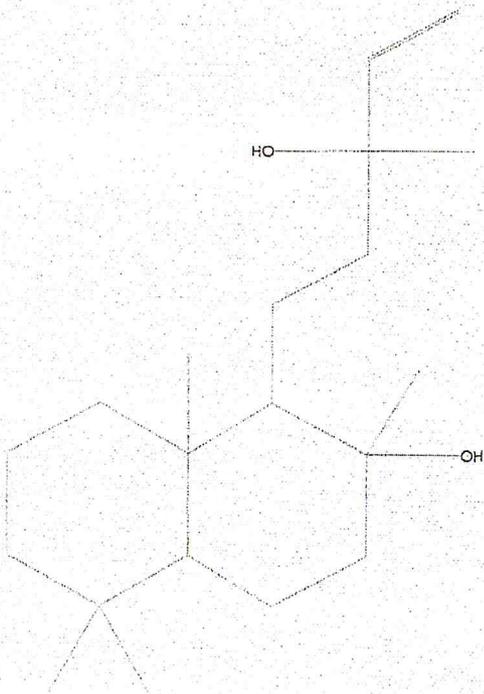
NL: 9.99E2
 S1868, RSI 927,
 replica, Entry#
 2140, CAS#
 629-60-1,
 Hexadecanal



NL: 9.99E2
 S1818, RSI 948, mainlib,
 Entry# 38410, CAS#
 56797-43-4,
 cis,cis,cis-7,10,13-
 Hexadecatrienal



Formula C₂₀H₃₆O₂, MW 308, CAS# 515-03-7, Entry# 9812
 Labd-14-ene-8,13-diol, (13R)-



Podocarp-7-en-3-one, 13β-methyl-13-vinyl
 Formula C₂₀H₃₀O, MW 286, CAS# 7715-48-2, Entry# 148738
 Pinara-7,15-dien-3-one

