

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET D'ÉCOLOGIE VÉGÉTALES

N°...../SNV/2023

THÈSE

Présentée par

**HAICHOOR Rima**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : BIOLOGIE VÉGÉTALE

THÈME

**PHYTOCHIMIE ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE *PINUS HALEPENSIS* DE  
L'EST ALGÉRIEN.**

Soutenue publiquement le 16/03/2023

DEVANT LE JURY

Président	Pr. Sahraoui Rachid	Université Farhat Abbas Sétif -1-
Directeur	Pr. Ramdani Messaoud	Université Farhat Abbas Sétif -1-
Examineurs	Pr. LogradaTakia	Université Farhat Abbas Sétif -1-
	Pr. Sarri Madani	Université Mohammed Boudiaf M'sila
	Pr. Zellagui Amar	Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi
	Pr. Gharaf Nour Eddin	Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi

*Laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles.*

## ***Remerciements***

Remerciements Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, le créateur de l'univers qui m'a donné la santé, la chance et le courage pour réaliser ce travail. Que tu sois loué éternellement et que ta miséricorde infinie continue à m'accompagner.

Tout d'abord, je voudrais remercier vivement mon Directeur de thèse **Monsieur le professeur Ramdani Messaoud**.

Je suis très reconnaissante de l'aide que vous m'avez apportée durant cette thèse, vous m'avez bien reçue dans votre équipe. Avec vous j'ai appris beaucoup de notions de phytochimie, notamment sur les huiles essentielles. Votre présence et votre disponibilité m'ont été précieuses, votre exigence et votre souci du moindre détail m'ont incitée à approfondir ma réflexion. Votre rigueur scientifique et votre claire voyance, votre méticuleuse organisation m'ont beaucoup appris et vous avez eu le courage de supporter ma lenteur. Je ne saurais vous remercier assez.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, malgré leurs multiples occupations. Mes plus vifs remerciements s'adressent à **Monsieur Sahraoui Rachid, Professeur** à la Faculté des Sciences **UFA Sétif 1**, de m'avoir fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse. Veuillez recevoir l'expression de ma respectueuse gratitude.

Je désire grandement remercier **Madame le professeur Lograda Takia** d'avoir accepté de faire partie du jury d'examen de cette thèse. Vos suggestions constructives ainsi que vos orientations scientifiques irréprochables m'ont été d'un apport inestimable.

Je tiens à remercier **Monsieur Sarri Madani, Professeur** à l'université **Mohammed Boudiaf de M'sila** qui m'a fait l'honneur d'accepter l'examen de la thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande considération. Je remercie également **Monsieur Zellagui Amar et Monsieur Gharaf Nour Eddine, Professeurs** à l'université **Larbi Ben M'hidi Dum El Bouaghi** d'avoir accepté de faire partie du jury d'examen de cette thèse et pour le temps qu'ils ont consacré pour mon travail.

Je remercie également **Monsieur Dehimi Mohammed Amine** conservateur principale des forêts et directeur du parc national de Belezma, Batna, **Monsieur Zeggada Toufik** chef de brigade forestier Aris Batna, **Monsieur Abdelhamid Khebtane** Maitre de conférences du centre universitaire de khenchela, le personnel de la direction générale de la conservation des forêts de la wilaya de Sétif pour leurs aides précieuses lors de mon échantillonnage.

Je remercie mes amies, mes collègues pour leurs disponibilités et leurs aides précieuses, **Madame Derafa Ismahane**, maitre de conférence à l'université Sétif-I de m'avoir beaucoup aidée dans les tests antimioxydants, **Dr Guendouz Ali** maitre de conférence à l'institut national d'agronomie unité de Sétif (INRAA) pour la réalisation de l'étude statistique et pour sa disponibilité à chaque fois que j'ai eu besoin de son aide et **Mr Bouteraa walid** maitre assistante à l'université de Skikda.

Une pensée chaleureuse accompagne toutes les personnes de l'équipe du laboratoire de recherche (VRBN): **Madame Sabrina Cherragui, Mademoiselle Najet Boumediane** avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans une ambiance amicale de joie et du travail fertile en discussion et en conseil.

Mes forts remerciements s'adressent à **Ma mère, Mon mari, Mes enfants** et toute **Ma famille** pour leur soutien, leurs encouragements et leur patience.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail et que j'ai peut-être omis de citer.

## ملخص:

خصص هذا العمل لدراسة التركيب الكيميائي و النشاط المضاد للبكتيريا والمضاد للإجهاد التأكسدي للزيوت الأساسية لنبات الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis* Mill.) المحصل عليه من 15 منطقة في الشرق الجزائري. تم استخلاص الزيوت الأساسية من الأجزاء الهوائية لنبات للصنوبر الحلبي بتقنية التقطير المائي والتي اعطت زيتا أصفر اشفاف بمرود استخلاص بمعدل  $0.37 \pm 0.64\%$  لكل العينات المدروسة. سمح أيضا التحليل الكيميائي لتركيب الزيوت الأساسية للعينات المدروسة بواسطة تقنية كروماتوغرافيا الغاز -مطياف الكتلة (GC / MS) Gas Chromatography–Mass Spectrometry، بتحديد 37 مركب بمتوسط  $99.4 \pm 0.4$  من اجمالي تركيب الزيوت. كانت غالبية المكونات عبارة عن مجموعة المركبات الهيدروكربونية (composés hydrocarbonés) ، كما سمح لنا التحليل الاحصائي بتحديد العديد من الأصناف الكيميائية الأخرى الموجودة بكثرة في الزيوت أهمها  $\alpha$ -Pinene ( $16.86\% \pm 3.35$ ) ، Myrcene ( $19.14\% \pm 6.67$ )، Caryophyllene-E ( $29.06\% \pm 8.5$ ) Terpinolene ( $3.94$ )، Humulene ( $4.81\% \pm 1.43$ )، Phenylethyl 3-methyl butanoate ( $5.67\% \pm 2.47$ ) ( $1.6 \pm 1.6\%$ ) و Sabinene ( $3.11\% \pm 1.84$ ). من جهة أخرى اعطى التحليل الاحصائي بواسطة UPGMA لعينات الزيوت الأساسية إمكانية تجميعها في 5 مجموعات، حيث أن المجموعة الأولى تحتوي علي مجموعة للزيوت الأساسية لمنطقة طارفنت (مدينة خنشلة، شرق الجزائر) و هذه المجموعة تتميز بوجود المركبات التالية:  $\Delta^3$ - Sabinene . myrcene – terpinolene تنقسم المجموعة الثانية الي مجموعتين، الأولى تتميز بوجود كل من  $\alpha$ -pinene ; caryophyllene-E ; في حين تضم المجموعة الأخرى المركبات التالية:  $\alpha$ -humulene ; caryophyllene-E ; myrcene. الدراسة التجريبية للنشاط البيولوجي للزيوت الأساسية أظهرت نشاط فعال ضد السلالات البكتيرية التالية ; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumonia*; *Salmonella enteric ssp. paratyphi*; *Listeria aeruginosa* *Pseudomonas* و *E. coli* ; *Proteus mirabilis* ; *Bacillus cereus innocua* ; بينما السلالات *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* لم تتأثر بهذه الزيوت. بالإضافة الي ذلك اختبار DPPH أظهر أن الزيوت التي تم اختبارها لها فعالية مضادة للأكسدة.

**الكلمات المفتاحية:** الصنوبر الحلبي، زيت أساسي، كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة، أصناف كيميائية، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للأكسدة.

## Résumé

Cette recherche est consacrée à l'étude de la composition chimique, l'activité antibactérienne et l'activité antioxydant des huiles essentielles du Pin d'Alep, obtenu de 15 localités de l'Est Algérien. Les huiles essentielles des parties aériennes du *Pinus halepensis* ont été extraites par hydro-distillation, donnant une huile transparente avec un rendement moyen de  $0,64\% \pm 0,37$ . Ces huiles ont été analysés chimiquement par Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC / MS). L'analyse a permis d'identifier 37 composés chimiques avec une moyenne de  $94,64\% \pm 4,87$  des huiles totale. La majorité des composants étaient des composés hydrocarbonés, avec les composants majoritaires, le caryophyllene-E ( $29.06\% \pm 8.5$ ), myrcene ( $19.14\% \pm 6.67$ ),  $\alpha$ -pinene ( $16.86\% \pm 3.35$ ), phenylethyl 3-methyl butanoate ( $5.67\% \pm 2.47$ ), -humulene ( $4.81\% \pm 1.43$ ), terpinolene ( $3.94\% \pm 1.6$ ) et sabinene ( $3.11\% \pm 1.84$ ). Les huiles essentielles du *P. halepensis* ont été classés en plusieurs chémotypes, dont le chémotype à (Sabinene -  $\Delta^3$ -carene – terpinolene), le chémotype à (myrcene,  $\alpha$ -pinene- caryophyllene-E), et le chémotype à (caryophyllene-E,  $\alpha$ -humulene – myrcene). L'étude expérimentale a montré une activité antibactérienne efficace contre les souches bactériennes ; *Staphylococcus aureus* ; *Klebsiella pneumonia* ; *Salmonella enteric spp arizonae* ; *Listeria innocua* ; *Proteus mirabilis* and *Bacillus cereus*. Ainsi que les huiles sélectionnées ont montrées une activité antioxydant efficace en utilisant le test DPPH.

**Mots clés** : *Pinus halepensis*, Huile essentielle, CG-SM, chémotypes, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

## **Abstract**

This research is devoted to the study of the chemical composition, the antibacterial activity and the antioxidant activity of the essential oils of Aleppo Pine, obtained from 15 localities in eastern Algeria. The essential oils from the aerial parts of *Pinus halepensis* were extracted by hydro-distillation, giving a transparent oil with an average yield of  $0.64\% \pm 0.37$ . These oils were chemically analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The analysis allowed the identification of 37 chemical compounds with an average of  $94.64\% \pm 4.87\%$  of the total oils. The majority of the components were hydrocarbon compounds, with the majority components, caryophyllene-E ( $29.06\% \pm 8.5$ ), myrcene ( $19.14\% \pm 6.67$ ),  $\alpha$ -pinene ( $16.86\% \pm 3.35$ ), phenylethyl 3-methyl butanoate ( $5.67\% \pm 2.47$ ),  $\alpha$ -humulene ( $4.81\% \pm 1.43$ ), terpinolene ( $3.94\% \pm 1.6$ ) and sabinene ( $3.11\% \pm 1.84$ ). The essential oils of *P. halepensis* have been classified into several chemotypes, including the (Sabinene -  $\Delta^3$ -carene – terpinolene) chemotype, the (myrcene,  $\alpha$ -pinene-caryophyllene-E) chemotype, and the (caryophyllene- E,  $\alpha$ -humulene–myrcene). The experimental study showed effective antibacterial activity against bacterial strains; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella enteric* spp *arizonae*; *Listeria innocua*; *Proteus mirabilis* and *Bacillus cereus*. As well as the selected oils showed effective antioxidant activity using the DPPH test.

**Key words:** *Pinus halepensis*, Essential oil, GC-SM, chemotypes, antibacterial activity, antioxidant activity.

## I. LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Rendements en huiles essentielles du <i>Pinus halepensis</i> en littérature.....	24
<b>Tableau 2.</b> Composition chimique des huiles essentielles de <i>Pinus halepensis</i> dans le monde.....	27
<b>Tableau 3.</b> Composition chimique des huiles essentielles de <i>Pinus halepensis</i> en Algérie.....	28
<b>Tableau 4.</b> Localisation des stations d'échantillonnage du <i>Pinus halepensis</i> . ....	33
<b>Tableau 5.</b> Composition chimique des huiles essentielles des populations de <i>Pinus halepensis</i> .....	46
<b>Tableau 6.</b> Les classes chimiques de l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> .....	48
<b>Tableau 7.</b> Composés de l'huile essentielle utilisés dans l'analyse statistique .....	50
<b>Tableau 8.</b> Matrice de corrélation des composants des huiles essentielles des populations de <i>Pinus halepensis</i> .....	52
<b>Tableau 9.</b> Chémotypes identifiés dans l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> .....	58
<b>Tableau 10.</b> Activité antimicrobienne des huiles essentielles des populations de <i>pinus halepensis</i> .....	62
<b>Tableau 11.</b> Principaux facteurs et interactions des huiles essentielles de <i>P. halepensis</i> .....	63
<b>Tableau 12.</b> Effet des d'huile sur les bactéries testées.....	64
<b>Tableau 13.</b> Effet des dilutions d'huile et des antibiotiques sur les bactéries testées.....	64
<b>Tableau 14.</b> Efficacité des huiles essentielles contre les bactéries testées.....	65
<b>Tableau 15.</b> Pourcentages d'inhibition des huiles essentielles du <i>pinus halepensis</i> .....	71
<b>Tableau 16.</b> Valeurs d'IC <sub>50</sub> des huiles essentielles de <i>P. halepensis</i> .....	75
<b>Tableau 17.</b> Principaux facteurs et interactions des huiles essentielles de <i>P. halepensis</i> de l'activité antioxydant.....	77
<b>Tableau 18.</b> Effet des différentes concentrations des huiles et du BHT sur le pourcentage d'activité antioxydant.....	77

## II. LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Vue d'ensemble de la structure générale des différentes familles chimiques.....	5
<b>Figure 2.</b> Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. ....	10
<b>Figure 3.</b> Sites d'une bactérie dans lesquels des composés naturels sont actifs.....	17
<b>Figure 4.</b> Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant.....	21
<b>Figure 5.</b> Aire de répartition du <i>P. halepensis</i> en Algérie. ....	23
<b>Figure 6.</b> Zones d'échantillonnage des populations du <i>pinus halepensis</i> .....	32
<b>Figure 7.</b> Technique de diffusion sur gélose par disques. ....	37
<b>Figure 8.</b> Rendements en huiles essentielles de <i>pinus halepensis</i> . ....	41
<b>Figure 9.</b> Chromatogrammes (FID et Masse) de l'huile essentielle de <i>P. halepensis</i> (population d'Iraguene).....	45
<b>Figure 10.</b> Classes chimiques de l'huile essentielle de <i>P. halepensis</i> .....	49
<b>Figure 11.</b> Variation de la concentration des composés majoritaires chez <i>P.halepensis</i> .....	51.
<b>Figure 12.</b> Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x2).....	53
<b>Figure 13.</b> Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x3).....	54
<b>Figure 14.</b> Projection des populations <i>pinus halepensis</i> , sur le plan (1x2).....	55
<b>Figure 15.</b> Projection des populations de <i>pinus halepensis</i> sur le plan (1x3).....	56
<b>Figure 16.</b> Projection spatiale des populations de <i>pinus halepensis</i> .....	56
<b>Figure 17.</b> Classification hiérarchique des populations du <i>pinus halepensis</i> .....	57
<b>Figure 18.</b> Profil des valeurs prédites et de la désirabilité pour les huiles de <i>Pinus halepensis</i> .....	66.
<b>Figure 19.</b> Pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles essentielles et le BHT.....	74
<b>Figure 20.</b> Activité antiradicalaire des huiles essentielles de <i>P. halepensis</i> .....	76
<b>Figure 21.</b> Profil de désirabilité de l'activité antioxydant des huiles essentielles de <i>pinus halepensis</i> .....	78

### iii. Liste des abréviations et symboles

**ACP** : Analyse en Composantes Principales.

**ANOVA** : Analyse de la variance.

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**BHT** : 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol.

**CG/MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.

**CPG/SM** : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

**DMSO** :Dimethylsulfoxyde.

**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.

**FID** : détecteur à ionisation de flamme.

**GN** : gentamicine

**HEs**: Huiles essentielles.

**HP** : Hewlett-Packard.

**IC50** : Concentration inhibitrice médiane.

**IR** : Indice de rétention.

**MeOH**: methanol.

**MHA** : géloseMueller–Hinton.

**IK** : Indice de Kovats

**IPP** : Isopentényle pyrophosphate

**MH** : Mueller Hinton agar

**PEP** : Phosphoénol pyruvate

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**UPGMA** : Unweighted Pair Group Method withArithmeticmean (Méthode de Groupe de Paires non Pondérée avec moyenne Arithmétique)

**LPS** : Couche lipopolysaccharide



# Table des Matières

<i>Remerciements</i> .....	I
ملخص.....	II
Résumé.....	III
Abstract .....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VI
Liste des abréviations et symboles.....	VII
Table des Matières.....	VIII
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1

## **IV. CHAPITRE I : GENERALITES**

<b>I. CARACTÉRISATION CHIMIQUE &amp; ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES (HES):</b> .....	4
I.1 Les huiles essentielles.....	4
I.2 Propriétés physiques .....	4
I.3 Composition chimique des huiles essentielles.....	5
I.3.1 Les terpènes et les terpénoïdes.....	6
I.3.2 Les Composés aromatiques ou phénylpropanoïdes .....	6
I.3.3 Les Composés d'origine diverses .....	6
I.4 Facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	6
I.5 Notion de chémotype ou chimiotype.....	7
I.6 Synthèse des huiles essentielles.....	8
I.7 Origine des huiles essentielles.....	9
I.8 Rôle des huiles essentielles.....	10
I.9 Principales utilisations des huiles essentielles.....	11
I.10 Méthodes d'extraction des huiles essentielles .....	12
I.10.1 L'hydrodistillation.....	12
I.10.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	12
I.10.3 Extraction par solvants .....	12
I.10.4 Extraction par fluide supercritique .....	13
I.11 Techniques d'analyse de la composition chimique des huiles essentielles.....	13
I.11.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	13

I.11.2	Spectrométrie de masse (SM) .....	14
I.11.3	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM).....	14
I.12	Activités biologiques des huiles essentielles .....	15
I.12.1	Activité antimicrobienne des huiles essentielles .....	15
I.12.2	Activité antioxydant des huiles essentielles .....	19
II.	GENERALITES SUR LE PIN D’ALEP .....	22
II.1	Les Pinacées .....	22
II.2	Monographie du <i>Pinus halepensis</i> Mill.....	22
II.3	Ecologie du pin d’Alep.....	23
II.4	Les huiles essentielles du Pin d’Alep .....	24
II.4.1	Rendement en huiles essentielles du <i>Pinus halepensis</i> .....	24
II.4.2	Composition chimique de l’huile essentielle de Pin d’Alep. ....	25
II.5	Propriétés biologique des huiles du <i>P. halepensis</i> .....	29
II.5.1	Activités antibactériennes de l’huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> .....	30
II.5.2	Activités antioxydants de l’huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> .....	31

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

I.	Matériel végétal .....	32
I.1	La récolte des plantes .....	32
I.2	Préparation des échantillons .....	33
II.	Méthodes .....	33
II.1	Extraction et caractérisation des huiles essentielles.....	33
II.1.1	Hydrodistillation .....	33
II.1.2	Calcul du Rendement en l’huile essentielle .....	34
II.1.3	Analyse Chromatographique des huiles essentielles.....	34
II.1.4	Identification des composés chimique.....	35
II.2	Evaluation de l’activité antibactérienne des huiles essentielle.....	35
II.2.1	Espèces bactériennes testées.....	35
II.2.2	Stérilisation du matériel.....	35
II.2.3	Milieu de culture.....	35
II.2.4	Préparation de l’inoculum et ensemencement .....	36
II.2.5	Dépôt de disque et lecture .....	36

II.3	Evaluation de l'activité antioxydant par DPPH.....	37
II.4	Analyse statistique des données.....	37
II.4.1	Analyse en composantes principales (ACP).....	38
II.4.2	Analyse UPGMA.....	38
II.4.3	Analyse de la variance.....	39
II.4.4	Test de désirabilité.....	39

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

I.	Rendement en huiles essentielles de <i>Pinus halepensis</i> .....	41
II.	Composition chimique des huiles essentielles du <i>Pinus halepensis</i> .....	44
II.1	Analyse en composantes principales (ACP).....	50
II.2	Variabilité des composants chimiques.....	50
II.3	Matrice des corrélations.....	51
II.4	Cercle des corrélations.....	53
II.5	Etude des populations de <i>Pinus halepensis</i> .....	54
II.6	Analyse UPGMA.....	57
III.	Activité antibactérienne des huiles essentielles du <i>P. halepensis</i> .....	61
III.1	Analyse de la variance (ANOVA).....	63
III.2	Test de désirabilité.....	65
IV.	Activité antioxydant des huiles essentielles de <i>P. halepensis</i> .....	70
IV.1	Variabilité de l'activité antioxydant des huiles essentielles.....	70
IV.2	Analyse statistique ANOVA de l'activité antioxydant.....	77
IV.3	Test de désirabilité.....	78
	<b>CONCLUSION</b> .....	78
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	80

# *INTRODUCTION*

## Introduction

En Algérie, les ressources naturelles, y compris les plantes médicinales et aromatiques possédant des molécules biologiquement actives jouent un rôle essentiel dans la médecine traditionnelle (Sahi, 2016) Alors, l'utilisation des substances d'origine végétale telles que les huiles essentielles offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Les huiles essentielles définies comme des composés volatils, naturels et complexes sont issues du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Les huiles essentielles, connues pour leurs propriétés antiseptiques c'est-à-dire bactéricide, virucide et fongicide, sont utilisées depuis l'antiquité et jusqu'à nos jours pour la conservation des aliments et comme des remèdes antimicrobiens, analgésiques, sédatifs, anti-inflammatoires, spasmolytiques et anesthésiques locaux (Fernandez *et al.*, 2014). Ainsi, les propriétés biologiques et thérapeutiques effectives des huiles essentielles sont en fonction directe avec la plante sélectionnée qui doit être qualifiées de plante médicinale aromatique puissante. En raison des propriétés thérapeutiques typiques de pin, les peuples Algériens ont utilisé depuis longtemps ses bourgeons, ses aiguilles, son essence et sa résine en médecine traditionnelle comme expectorant, balsamique, antiseptique et antirhumatismal (Schiller, 2014).

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.), de par sa couverture forestière, sa plasticité remarquable et son rôle socio-économique, est considéré comme une composante essentielle de la forêt méditerranéenne et représente un capital forestier de grande valeur pour la majorité des pays du pourtour méditerranéen et plus particulièrement pour l'Algérie (Quézel, 1986 ; Correal- Mòdol et Casals, 2012).

Les propriétés médicinales et aromatiques des composés chimiques (térébenthine, résine et huiles essentielles, etc) du pin d'alep en font l'une des plantes les plus populaires de toutes les civilisations. Il a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques dans le but d'identifier ses principaux composants actifs (Hmamouchi *et al.*, 2001; Macchioni *et al.*, 2003; Dob *et al.*, 2007; Tumen *et al.*, 2010; Abi-Ayad *et al.*, 2011; Ustun *et al.*, 2012, Djerrad *et al.*, 2015, Fekih *et al.*, 2015, Sadou *et al.*, 2015 ; Mohareb *et al.*, 2017 ; Ioannou *et al.*, 2014 ; El-Settawy *et al.*, 2016 ; Nam *et al.*, 2016, Taraj *et al.*, 2018). Ces études ont révélé que *Pinus halipensis* est riche en plusieurs constituants hétérogènes tels que les lipides, les protéines, les sucres, les composés phénoliques, et des flavonoïdes dont les teneurs varient selon les conditions géographiques et climatiques (Cheikh-rouhou *et al.*, 2006 ; Kadri *et al.*, 2014).

Une très grande variété de terpènes a été identifiée dans les populations de pin d'alep à travers le monde. Les composés présents en plus grandes quantités sont des mono ou des sesquiterpènes et leurs concentrations varient d'une population à une autre. Le E caryophyllène, l' $\alpha$ -pinène, et le myrcène sont les plus répandus.

Plusieurs études visant à évaluer le potentiel phytochimique de différentes espèces de pins ont été rapportées dans la littérature. Ces travaux se penchent particulièrement sur le potentiel antioxydant, antibactérien, antifongique, anti inflammatoire. Il existe aussi quelques études sur le potentiel anticancéreux d'extraits de pins et de composés provenant du genre *Pinus*. Ainsi, l'existence d'une diversité génétique intra-population importante révélée par les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

En raison des propriétés thérapeutiques typiques du pin, la population Algérien a utilisé depuis longtemps les bourgeons, les aiguilles, l'essence et la résine de cette espèce, en médecine traditionnelle, comme expectorant, balsamique, antiseptique et antirhumatismal.

Dans le cadre de la valorisation de nos ressources biologiques naturelles, le présent travail est destiné à caractériser la composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill., et d'évaluer son activité antibactérienne vis-vis de huit souches bactériennes de gram (+) et (-), et l'activité antioxydant par le test du DPPH.

Ce travail de thèse portant principalement sur la composition chimique et les activités biologiques des huiles essentielles de *Pinus halepensis* de l'Est Algérien a deux objectifs majeurs :

**Un objectif fondamental** est d'accroître notre connaissance des constitutions chimiques des huiles essentielles des différentes populations échantillonnées et plus particulièrement de caractériser les chémotypes caractérisant les populations des différentes provenances de l'Est algérien.

**L'étude de la variabilité géographique** des huiles essentielles afin de détecter une éventuelle spécificité régionale ou micro-régionale en vue d'une valorisation de l'espèce.

Notre travail de recherche est subdivisé en trois chapitres :

- ❖ Le premier chapitre « **Généralités** » englobe deux parties ;
  - La première partie est consacrée aux huiles essentielles, aux techniques de leurs extractions, leurs compositions chimiques, leurs propriétés physiques, ainsi que leurs importances et leurs utilisations dans les activités biologiques.

- La seconde consiste la description botanique, la répartition géographique, l'utilisation, la composition chimique et les propriétés biologiques du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill).
- ❖ Le deuxième chapitre regroupe la description de la zone d'étude, les méthodes et le matériel utilisé pour obtenir les résultats.
- ❖ Dans le troisième chapitre sont regroupées les résultats obtenus de cette étude ainsi que leurs discussions. La rédaction de la thèse se termine par une conclusion générale présentant des perspectives de cette recherche.

*CHAPITRE I :*  
*GENERALITES*



### I. CARACTÉRISATION CHIMIQUE & ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

#### I.1 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles ou essences végétale constituent des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal ; odorantes et très volatiles, elles s'évaporent rapidement dans l'air (Padrini et Lucheron, 1996). Parmi les huit cent mille espèces du monde végétal, seulement dix pour cent sont capables de synthétiser une essence végétale (Adlercreutz *et al.*, 2003).

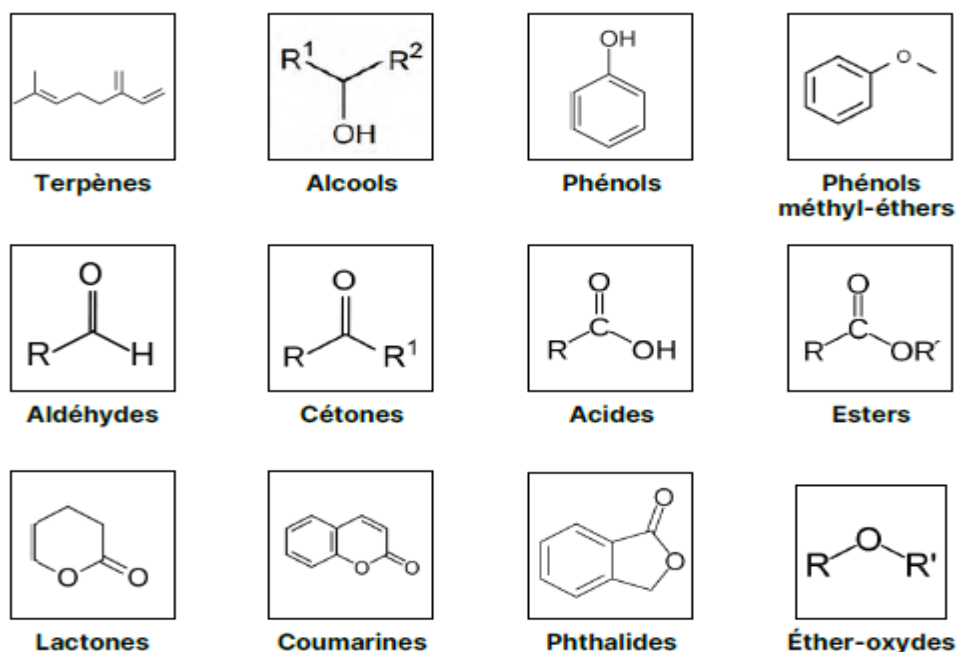
L'huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques: soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche (Hanif *et al.*, 2019). Issues de plantes aromatiques, les huiles essentielles sont composées majoritairement de molécules volatiles, qui sont principalement des terpènes (Garnero *et al.*, 1996 ; Fernandez *et al.*, 2014).

#### I.2 Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Très rarement colorées, ce sont « des liquides d'odeur et de saveur généralement fortes ». En plus, l'huile essentielle peut être visqueuse et peu miscible dans l'eau, mais généralement solubles dans les solvants organiques. Elles sont pâteuse ou encore un mélange solide-liquide (Couic-Marinier et Lobstein, 2013 a, b). La plupart des huiles essentielles ont une couleur jaune presque imperceptible. Dans certains cas extrêmes, les huiles essentielles vieilles et oxydées présentent un risque toxique important (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012). Les huiles essentielles sont très réfringentes, hydrophobes lipophiles, et très peu solubles ou pas du tout dans l'eau. Elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille. La densité relative des huiles essentielles est généralement inférieure à celle de l'eau alors qu'il existe plusieurs exceptions (Dijilani et Dicko, 2012). Les huiles essentielles sont en grande partie solubles dans les graisses, les alcools et la plupart des solvants organiques (Hanif *et al.*, 2019). En outre, elles ont la sensibilité d'être oxydées pour former des produits résineux par polymérisation (Li *et al.*, 2014). Les huiles essentielles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (Degryse *et al.*, 2008).

### I.3 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont composées de plusieurs molécules chimiques très complexes, présentant une diversité considérable (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). Généralement, les composants principaux déterminant les propriétés biologiques des huiles essentielles, comprennent deux classes d'origine biosynthétique distincte. La classe principale est composée de terpènes et l'autre de constituants aromatiques et aliphatiques. Tous caractérisés par un faible poids moléculaire, ce sont les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques, les monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés, les esters, les aldéhydes, les cétones, les alcools, les phénols et les oxydes et des produits de réarrangement. Ils sont également considérés comme des composés terpéniques (Tongnuanchan et Benjaku, 2014 ; Sharifi-Rad *et al.*, 2017) ainsi que d'autres composés tels que les diterpènes, les constituants contenant du soufre de l'azote et les lactones (Figure 1) (Zuzarte et Salgueiro, 2015), suivie par les phénylpropanoïdes (Schnaubelt, 2011).



**Figure 1.** Structure générale des différentes familles chimiques des huiles essentielles.

#### I.3.1 Les terpènes et les terpénoïdes

Les terpènes constituent les principaux composants des huiles essentielles avec près de 80 000 de composés différents identifiés (Christianson, 2017). Le mot terpène vient de la térébenthine, oléorésine issue notamment de plantes et qui contient certains hydrocarbures initialement nommés « terpènes » (Breitmaier *et al.*, 2006). Chimiquement, ce sont principalement des hydrocarbures insaturés cycliques, à des degrés variables d'oxygénation

(alcoolique, cétonique, etc.) dans les groupes substituants liés au squelette carboné basique (Zuzarte et Salgueiro, 2015).

Cependant, les terpénoïdes sont des terpènes dérivées des composés ayant un ou plusieurs groupes chimiques fonctionnels (alcool, aldéhyde, cétone, acide) (Lamarti *et al.*, 1994).

Les principaux terpènes sont les monoterpènes ( $C_{10}$ ), formés du couplage de deux unités d'isoprène, les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), les hémiterpènes ( $C_5$ ), les diterpènes ( $C_{20}$ ), les triterpènes ( $C_{30}$ ), les tétraterpènes ( $C_{40}$ ) et les polyterpènes  $(C_5H_8)_n$  existent également dans l'huile essentielle. Les monoterpènes sont les molécules les plus représentatives dans les huiles, suivis des sesquiterpènes (Rhind, 2012 ; Zuzarte et Salgueiro, 2015).

### **I.3.2 Les Composés aromatiques ou phénylpropanoïdes**

Les composés aromatiques ou phénylpropanoïdes, sont dérivés du phénylpropane, et se produisent moins fréquemment que les terpènes dans les huiles essentielles et eux aussi peuvent contenir différentes fonctions (Dhifi *et al.*, 2016). Les voies biosynthétique des terpènes et dérivés phénylpropaniques sont généralement différent dans les plantes (Bakkali *et al.*, 2008), en plus, elles donnent des caractères organoleptiques des huiles essentielles différents (Kunle *et al.*, 2003).

### **I.3.3 Les Composés d'origine diverses**

Les huiles essentielles peuvent aussi renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînés lors de l'hydrodistillation comme des carbures, des acides ( $C_3$  à  $C_{10}$ ), des alcools, des esters, des lactones et, plus rarement, des dérivés de l'azote et du soufre (Baser et Demirci 2007 ; Bakkali *et al.*, 2008 ; Dhifi *et al.*, 2016).

## **I.4 Facteurs de variabilité des huiles essentielles**

Selon Figueiredo *et al.* (2008) la présence ou l'absence de certains constituants dans la plante dépend de l'un ou de la combinaison de trois facteurs (le patrimoine génétique, l'âge et l'environnement de la plante). L'influence des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité (Boaro *et al.*, 2019), l'altitude et la latitude (Sadeghi *et al.*, 2014 ; Elkady *et al.*, 2021), la nature du sol (Oliveira *et al.*, 2005) sur la composition chimique et le rendement des huiles essentielles a été décrite. La composition des huiles essentielles est variable selon l'organe et l'origine géographique (Hendawy *et al.*, 2018; Dodoš *et al.*, 2019). Certaines auteurs se sont préoccupés d'autres facteurs qui influent sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles tels que le cycle végétatif (Djerrad *et al.*, 2017), l'âge et l'organe végétal (Hajdari *et al.*, 2015), la période de récolte (Xie *et al.*, 2015), les conditions de conservations, les parasites, les virus et les mauvaises herbes (Svoboda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2001).

L'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs. Alors que les composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svoboda et Hampson, 1999).

Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient également en fonction de la méthode d'extraction (Pirbalouti *et al.*, 2013 ; Kamiie *et al.*, 2014 ; Elyemni *et al.*, 2019). Les changements les plus importants interviennent pendant l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (l'acidité, température) et de la durée d'extraction (Božović *et al.*, 2018 ; Arora *et al.*, 2016). D'autres facteurs tels que les traitements auxquels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique ou enzymatique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (Lagunez, 2006). La durée de séchage affecte aussi bien le rendement que la composition des huiles essentielles (Yayi *et al.*, 2004).

Les conditions principales requises pour une production rentable en huile essentielle sont : un bon matériel végétal, la variété de la plante, le sol, l'équipement de distillation et le climat (Smallfield, 2001).

### **I.5 Notion de chémotype ou chimiotype**

Le chémotype, clé d'aromathérapie, est un groupe chimiquement défini au sein d'une population morphologiquement indiscernables (Collin *et al.*, 1993). Le concept de chémotype permet de distinguer deux ou plusieurs huiles essentielles de composition chimique différente produites à partir de plantes de la même espèce, définie par sa dénomination scientifique et non à partir de sa dénomination commune. Le chémotype correspondant au composant majoritaire dont l'action est influencée et complétée par des molécules secondaires (Couic-Marinier et Lobstein, 2013a).

Les différences de types chimiques peuvent être très importantes et impliquent des changements considérables au niveau des propriétés chimiques et biologiques de l'huile essentielle et par conséquent de ses indications et contre-indications thérapeutiques. Des individus de la même espèce botanique, ayant le même génome et le même phénotype, peuvent présenter des différences significatives au niveau de leur composition chimique. Celle-ci est sous l'influence de nombreux facteurs autres que la détermination génétique, comme la qualité du sol, le climat, l'altitude, l'hygrométrie, le moment de la cueillette, la situation géographique (Zhiri et Baudoux, 2005).

Une espèce morphologiquement homogène peut donner des huiles essentielles de compositions chimiques différentes. Ce phénomène a été mis en évidence pour le thym et le basilic (Kasali *et al.*, 2005). Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile

essentielle est variable. La plupart sont poly-moléculaires, c'est à dire composées d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de rose). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), des composés minoritaires sont présents (Pibiri, 2006).

La composition chimique de l'HE au sein d'une même espèce, peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents (Ou polymorphisme chimique). L'un des exemples le plus démonstratif qu'on peut citer est celui du thym (*Thymus vulgaris*), cette espèce à six chémotypes différents (Chizzola *et al.*, 2008). Cette différence chimique est due à la nature du monoterpène majoritaire qui peut être soit le géraniol, le linalol, l' $\alpha$ -terpinéol, le 4-thuyanol, le carvacrol ou le thymol (Thompson *et al.*, 2003). Chacune de ces molécules a leurs propres propriétés qui peuvent parfois être antagonistes entre elles. Ceci implique l'importance de classer les huiles essentielles avec leurs chémotypes pour une utilisation plus sûre et efficace (Bonnafous, 2013). Il est important de noter que les huiles essentielles à chémotype différent présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri, 2005).

### I.6 Bioynthèse des huiles essentielles

Toutes les plantes sont capables de produire des essences, souvent à l'état des traces. Les plantes médicinales aromatiques sont celles qui en produisent en quantité plus importante. Ces plantes aromatiques se répartissent sur plusieurs familles botaniques, citons comme exemple les Lamiaceae, les Astéraceae, les Apiaceae, les Cupressaceae, les Rutaceae, les Lauraceae, les Myrtaceae (Baser et Buchbauer, 2009).

La biosynthèse des essences est issue du métabolisme secondaire des plantes, à partir du fructose provenant de la photosynthèse. Cette biosynthèse des molécules aromatiques volatiles est réalisée en deux voies principales, utilisant comme intermédiaires soit l'acide mévalonique, soit l'acide shikimique respectivement pour les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (Singh *et al.*, 1990).

→ **La voie des terpènes** : La voie de base de la biosynthèse des terpénoïdes volatils est traitée convenablement en trois phases: (1) formation des unités C5 de base, (2) condensation de deux ou trois unités C5 pour former des prényl diphosphates en C10, C15 ou C20, et (3) conversion des prényl diphosphates résultants aux produits finis (Dudareva *et al.*, 2004). Elle aboutit à la formation de produits terpénoïdes par conjugaison de plusieurs unités de la molécule de base, l'IPP isopentényl pyrophosphate. Les monoterpènes, diterpènes ou sesquiterpènes constitués subissent ensuite des réactions d'oxydoréductions successives et acquièrent ainsi différentes fonctions

oxygénées de type alcool, phénol, aldéhyde, cétone, etc. (Habtemariam, 2019). Ces réactions, réalisées par une grande famille d'enzymes connues sous le nom de terpènes synthases (TPS) (Rehman *et al.*, 2016).

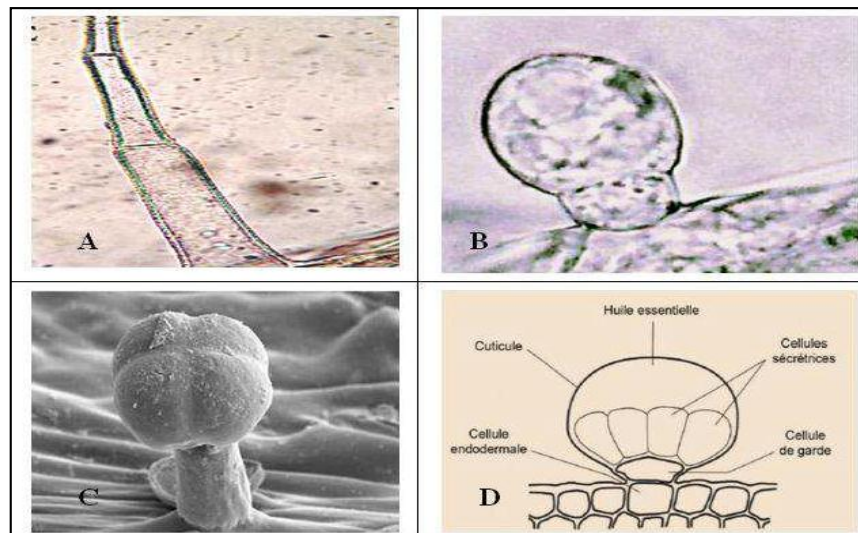
→ **La voie du phénylpropane** : De cette deuxième voie, sont issus des constituants de type phénylpropanoïdes synthétisés à partir d'un métabolite du fructose, le PEP phosphoénolpyruvate. En passant par l'élaboration de molécules acides comme l'acide shikimique ou cinnamique, elle aboutit à différents composés oxydés : des phénols, des acides, des coumarines, puis au final des lactones et des méthyléthers (Vogt, 2010).

De plus, l'aromatisation de l'acide shikimique donne des dérivés de l'acide benzoïque, présents dans plusieurs huiles essentielles (Sell, 2020).

### **I.7 Origine des huiles essentielles.**

La synthèse des huiles essentielles se fait au sein de différents tissus sécréteurs dans tous les organes de la plante; dans les feuilles (la menthe poivrée), les fleurs (le bergamotier), mais aussi dans les écorces (le cannelier de Ceylan), dans le bois (le santal), les rhizomes (le gingembre), des fruits (la badiane), ou des racines (l'angélique), encore des graines comme chez la muscade étant produites et stockées dans des structures sécrétoires qui diffèrent par la morphologie, la structure, la fonction et la distribution (**Figure 2**). Ces structures spécialisées minimisent le risque d'autotoxicité et peuvent se trouver à la surface des organes ou dans les tissus de la plante, en tant que structure de sécrétion externe ou interne respectivement. Ces tissus peuvent également produire des substances à composition chimique proche des huiles essentielles, insoluble dans l'eau, et non volatiles comme les résines (Svoboda *et al.*, 2000). Les structures de sécrétion internes comprennent les cellules de sécrétion (souvent des idioblastes), les cavités sécrétoires et les canaux sécréteurs, tandis que les canaux externes comprennent les trichomes glandulaires, les cellules épidermiques et les osmophores (Caissard *et al.*, 2004 ; Yu *et al.*, 2018 ; Lee *et al.*, 2016).

Cette huile essentielle doit être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue dont la quantité et la qualité diffèrent, pour cela il est nécessaire de spécifier le nom de la partie utilisée (Bruneton, 1999).



**Figure 2.** Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*, (B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium*, (C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris* (Yu *et al.*, 2018).

### I.8 Rôle des huiles essentielles.

Les huiles essentielles semblent jouer un rôle important dans l'adaptation à l'environnement (Sousa, 2012). Certains composés volatiles produits par les plantes et que l'on retrouve dans les essences vont moduler le comportement des microorganismes, champignons, insectes et herbivores. Elles agissent contre plusieurs maladies parasitaires des plantes et même les maladies causées par les ravageurs phytophages, mais aussi elles jouent un rôle important dans la reproduction et la dispersion des végétaux puisqu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs (Cseke *et al.*, 2016). Ainsi, les essences pourraient être des outils de défense contre les prédateurs, de répulsion des insectes et herbivores ou encore de protection contre les pathogènes. Elles seraient impliquées dans des processus allélopathiques et des interactions trophiques (Bali *et al.*, 2016), et aussi contre les herbivores en réduisant leur appétit pour la plante (Wink, 2015).

### I.9 Principales utilisations des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont utilisées dans les industries chimiques en tant que produits naturels, soit pour la fabrication de nouvelles molécules (Brud, 2020). Ces isolats peuvent être utilisables pour la synthèse de principes médicamenteux, des vitamines, de substances odorantes etc. Actuellement les huiles essentielles trouvent leurs utilisations dans différents secteurs tels que les industries pharmaceutiques et cosmétiques en raison de leurs propriétés thérapeutiques et aromatiques (Dijilani et Dicko, 2012 ; Turek et Stintzing, 2013 ; Millet, 2013) et en industries

agroalimentaires où elles sont utilisées comme agents naturels de conservation grâce à la présence dans leurs compositions de produits ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydants (Marto et al., 2016 ; Lourenço *et al.*, 2019 ; Nazari *et al.*, 2019 ; Ksouda *et al.*, 2019). Les huiles essentielles représentent un outil thérapeutique très efficace (Robard, 2004 ; Millet, 2010 ; Djilani et Dicko, 2012) qui permet d'élargir le champ des traitements médicaux conventionnels. Les huiles essentielles peuvent être utilisées directement comme agents thérapeutiques (Raut et Karuppaiyl, 2014), mais aussi comme matières premières pour la synthèse de principes actifs (Mondiale, 2013).

### **I.10 Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Plusieurs méthodes d'extraction innovantes sont mises au point (Reyes-Jurado *et al.*, 2015 ; Stratakos et Koidis, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018). La distillation est le procédé le plus anciennement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (Baser et Buchbauer, 2009). Seuls la distillation et l'expression à froid permettent d'obtenir des huiles essentielles conformes à la pharmacopée européenne. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'huile dans le végétal et de son utilisation (Marouf et Tremblin, 2016). En effet, le mode technologique d'exploitation du matériel végétal peut avoir une influence sur la composition chimique finale de l'essence. Bien qu'il semble relativement simple d'isoler de telles huiles, la composition de ces dernières peut varier dans une large mesure en fonction de la méthode d'extraction utilisée (Stratakos et Koidis, 2016 ; Conde-Hernández *et al.*, 2017).

#### **I.10.1 L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation utilise un appareil de type Clevenger, où le matériel végétal doit immerger dans un bain d'eau, et l'ensemble est porté à ébullition. Par conséquent, la solution aqueuse contenant des composés volatils, diffuse ensuite à travers le tissu de l'organe végétal vers la surface extérieure où l'huile essentielle sera vaporisée avec l'eau (vapeurs hétérogènes), et ensuite le mélange est refroidi. L'eau et les huiles essentielles, une fois condensées, se séparent en deux phases par différence de densité (Başer et Buchbauer, 2009). Ce procédé présente des inconvénients dûs principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition ; Certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (Garnero, 1996).

Le contact prolongé de la matière première avec l'eau au cours de l'hydrodistillation, provoque non seulement une hydrolyse partielle des esters et une altération chimique des molécules terpénique (Zizovic *et al.*, 2007) mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, une solubilité de certains composés ayant une certaine polarité, des



notes de brûlé. Ces réactions peuvent entraîner des changements dans la composition chimique de l'huile essentielle (Gavahian *et al.*, 2012).

### **I.10.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

C'est la seule distillation préconisée par la Pharmacopée française, car elle minimise les altérations hydrolytiques. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est placé dans l'alambic sur une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau. Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée mais pas avec l'eau bouillante. La vapeur provoque la rupture d'un grand nombre de glandes qui libèrent leurs composés aromatiques. En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène composé d'HE et d'hydrolat (Marouf et Tremblin, 2016). Cette méthode englobe deux procédures d'extraction ; l'extraction par hydrodistillation et l'extraction par hydro-diffusion.

### **I.10.3 Extraction par solvants**

La technique d'extraction par solvants est la plus pratique, et consiste à placer le matériel végétal à traiter avec un solvant (l'hexane est le plus utilisé depuis longtemps), dans un extracteur (Lagunez Rivera, 2006). Cette technique d'extraction peut être réalisée par l'utilisation du dioxyde de carbone comme un solvant excellent, sous une basse température et haute pression (Costa *et al.*, 2016). La technique peut être basée sur l'enfleurage à froid (ou macération à saturation), et elle consiste à mettre les fleurs (la partie fragile de la plante) en contact avec deux couches épaisses de matière (Soe'eib *et al.*, 2017). En outre, la procédure d'extraction des huiles essentielles peut être réalisée par l'enfleurage à chaud (digestion ou macération) qui consiste à immersion des fleurs dans une graisse animale clarifiée préalablement chauffée dans une chaudière en cuivre à 60°C (ou au bain-marie) pendant 12 à 24 heures (Roopashree *et al.*, 2019).

### **I.10.4 Extraction par fluide supercritique**

Les extraits obtenus par extraction par fluide supercritique (SFE) sont aussi compris dans l'appellation « huile concrète ». La SFE sur une plante correspond à une extraction solide-liquide en utilisant un fluide supercritique comme solvant d'extraction.

Un fluide supercritique est un fluide chauffé au-delà de sa température critique et comprimé au-dessus de sa pression critique. Ce fluide peut alors avoir la densité d'un liquide et la viscosité d'un gaz, ce qui se traduit par une bonne diffusibilité dans les solides et un bon pouvoir solvateur donc une meilleure cinétique et efficacité d'extraction (Da Silva *et al.*, 2016 ; Khaw *et al.*, 2017). Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est le fluide supercritique le plus couramment utilisé même si l'eau peut aussi être utilisée. Sous haute pression, le CO<sub>2</sub> se transforme en liquide qui est utilisé comme

solvant pour extraire les molécules d'intérêt de la matière première. Après l'extraction, aucun résidu de solvant ne reste dans le produit final puisque le CO<sub>2</sub> liquide redevient un gaz et s'évapore sous pression atmosphérique et température ambiante, l'huile concrète est alors obtenue. Cette méthode d'extraction produit un rendement plus élevé et une viscosité plus faible. De nombreuses huiles essentielles qui ne peuvent pas être extraites par distillation à la vapeur d'eau peuvent être obtenues avec l'extraction du dioxyde de carbone (Capuzzo *et al.*, 2013).

### **I.11 Techniques d'analyse de la composition chimique des huiles essentielles**

Les techniques d'analyse des huiles essentielles ont pour but de déterminer la composition d'un échantillon et de doser les éléments le constituant. L'étude de la composition chimique d'une huile essentielle est généralement réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) consiste à purifier chacun des constituants avant de les identifier, par comparaison de leurs données spectrales avec celles de référence, elle peut également être utilisée pour identifier les constituants des HE, dans le but d'apporter des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule et ses fonctions chimiques (Tomi *et al.*, 2006).

#### **I.11.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie est une puissante technique de séparation qui trouve de nombreuses applications dans tous les domaines de la science. Réalisée expérimentalement en 1952 par James et Martin, la CPG s'est montrée une méthode des plus appropriées à la séparation et à l'identification des constituants des huiles essentielles, particulièrement avec la programmation de la température.

Elle permet à la fois l'analyse qualitative et quantitative (Paris et Godon, 1979). Elle permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (*I<sub>r</sub>*). Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. En CPG, l'échantillon est injecté et vaporisé au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur ; lorsqu'un constituant de l'échantillon le traverse, un pic apparaît sur l'enregistreur.

Après la séparation par chromatographie, les pics des échantillons doivent être identifiés. Ils sont définis par l'injection des étalons purs et par des données de rétention. Les indices de rétention ont été introduits par Kovats (*I<sub>K</sub>*), ils constituent pour chaque substance une grandeur de rétention assez reproductible. Ils sont calculés à partir d'une gamme d'alcane. L'identification consiste en

la comparaison des indices de rétention à ceux des étalons purs injectés parallèlement. Cependant, l'utilisation d'étalons et d'indices de rétention pour une analyse qualitative et quantitative des échantillons étudiés limite l'efficacité de la CPG (les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre) et impose son couplage avec d'autres méthodes telles que la spectrométrie de masse. Cette dernière a la capacité d'identifier un très grand nombre de composés présents dans le mélange à analyser.

### **I.11.2 Spectrométrie de masse (SM)**

Selon Skoog *et al.* (2017) la spectrométrie de masse est parmi toutes les techniques analytiques, celle dont le domaine d'application est le plus étendu. En effet, elle peut fournir des informations concernant la composition élémentaire d'un échantillon, la structure des molécules inorganiques, organiques et biologiques ; la composition qualitative et quantitative des mélanges complexes, etc ...

### **I.11.3 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est un outil puissant et approprié pour la détermination des composés volatils en raison de son efficacité de séparation élevée et de sa détection sensible (Li *et al.*, 2013).

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique (De MAACK et SABLIER ; 1994). Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse (Bruneton, 1999 ; Desjobert *et al.*, 1997). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (Joulain et König, 1998.).

Le manque de reproductibilité des temps de rétention d'un appareil à l'autre ou d'une colonne à l'autre est l'un des problèmes de la CPG, même si elles sont de nature identique. Alors, un indice de rétention (IK) a été proposé par le chimiste suisse Ervin Kováts, en considérant que la montée de température du four est linéaire sur la plage de température étudiée et que cet indice est indépendant des conditions chromatographiques (Van Den Dool et Kratz, 1963). L'indice de rétention est une grandeur caractéristique de chaque composé et du type de colonne.

$$\text{Indice de rétention } IK = 100n + (100x) \frac{Tr[A] - Tr[C_n]}{Tr[C_{n+1}] - Tr[C_n]}$$

Tr (A) : Temps de rétention du composé inconnu A.

Tr (n) : Temps de rétention d'l'hydrocarbure à n atomes de carbone.

Tr (C<sub>n1</sub>) : Temps de rétention d'l'hydrocarbure à n +1 atomes de carbones.

## I.12 Activités biologiques des huiles essentielles

Les molécules biochimiques différentes des huiles essentielles leurs confèrent des rôles et propriétés biologiques variés (Sharifi-Rad *et al.*, 2017). De nombreuses études ont démontré que l'activité biologique d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (Chouhan *et al.*, 2017). Les composés chimiques de plus grande efficacité sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools ( $\alpha$ -terpinéol, terpinène-4-ol et linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes (Cosentino *et al.*, 1999 ; Dorman et Deans, 2000). Les alcools agissent généralement en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (Dorman et Deans, 2000). Les aldéhydes agissent par des réactions de transferts d'électrons réagissant avec des composés nitrés (protéines et acides nucléique) vitaux pour la bactérie (Dorman et Deans, 2000).

### I.12.1 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'énorme diversité des structures des composés naturels d'origine végétale permet d'obtenir des agents antimicrobiens efficaces. Les activités biologiques des huiles essentielles sont largement étudiées, certaines d'entre elles sont scientifiquement confirmées (Wińska *et al.*, 2019). Elles représentent un modèle idéal pour l'étude et l'utilisation dans la prévention et le traitement des maladies humaines causées par les pathogènes les plus courants (Murbach *et al.*, 2014).

Les huiles essentielles ont, à des degrés divers, des propriétés antimicrobiennes très marquées (Wińska *et al.*, 2019). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Elles peuvent exercer une activité létale (Effet bactéricide ou bactéricidie), comme elles peuvent entraîner une inhibition de la croissance être bactéricides ou bactériostatiques (Effet bactériostatique ou bactériostase) (Höferl *et al.*, 2009).

Ce pouvoir s'exerce sur un nombre assez élevé de bactéries pathogènes, y compris des souches habituellement résistantes. Cette propriété est en rapport direct avec leur richesse en terpènes (Sharma *et al.*, 2019). Spécifiquement, les monoterpénoïdes affectent la multiplication et le développement des micro-organismes en interférant avec leurs processus physiologiques et biochimiques au cours de leurs développements et multiplications (Pandey *et al.*, 2017). Actuellement, les mécanismes d'action les plus connus et les plus étudiés parmi les agents antimicrobiens sont liés à une grande variété de cibles et de processus bactériens, tels que l'inhibition de la synthèse des protéines, l'inhibition des voies métaboliques, l'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire, l'inhibition de l'ADN et la synthèse d'ARN et la lyse de la membrane bactérienne (Alvarez-Martínez *et al.*, 2021). Les mécanismes d'action des composés naturels sont liés à la désintégration de la membrane cytoplasmique, à la déstabilisation de la force proton-motrice (FPM), au flux d'électrons, au transport actif et à la coagulation du contenu cellulaire. Tous les mécanismes d'action ne fonctionnent pas sur des cibles spécifiques et certains sites peuvent être affectés par d'autres mécanismes (Bassolé *et al.*, 2012 ; Nazzaro *et al.*, 2013 ; Guimarães *et al.*, 2019). Le mécanisme d'action antimicrobien semble avoir un lien avec un grand nombre de constituants complexes notamment dans les HE, au lieu de métabolites bioactifs spécifiques, ce qui peut entraîner des modes d'action différents et une identification difficile du point de vue moléculaire (Burt, 2004).

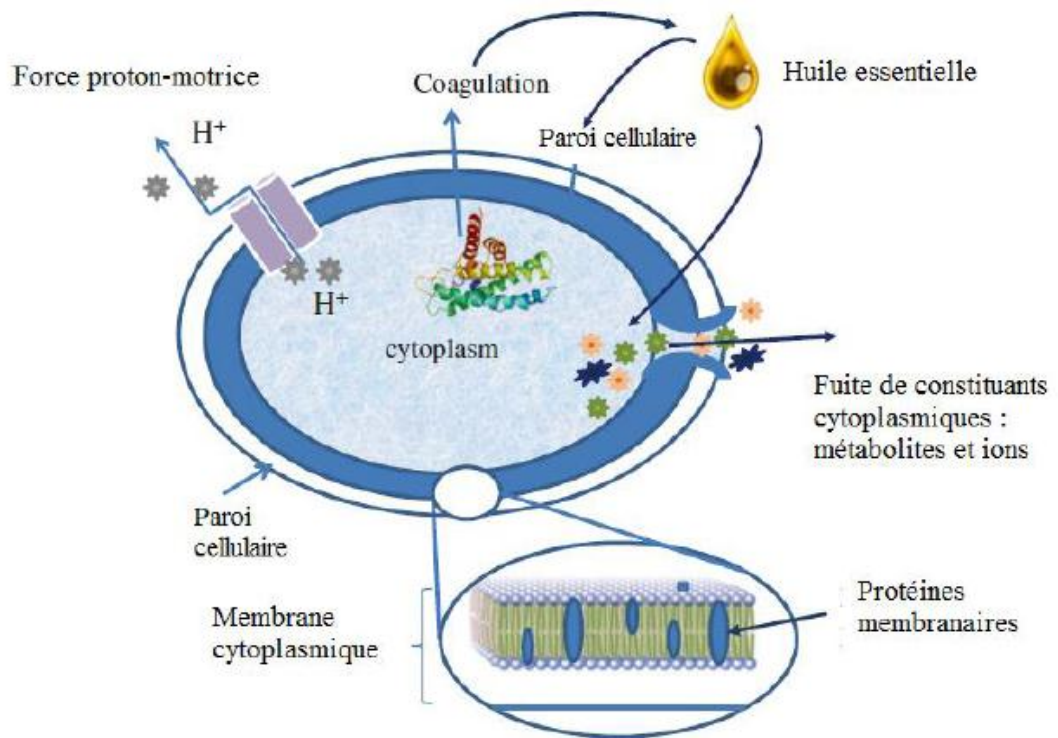
En général, les actions antimicrobiennes des HE sont décrites en trois phases (Burt 2004 ; Turina *et al.*, 2006).

- Premièrement, la propagation des HE dans la paroi cellulaire d'une bactérie grâce aux composants hydrophobes, améliore la perméabilité de la membrane, ce qui entraîne une perturbation et la perte ultérieure de composants cellulaire.

- La seconde correspond à une acidification à l'intérieur de la cellule qui bloque la production d'énergie cellulaire (ATP) en raison de la perte d'ions, de l'effondrement des pompes à protons et de la réduction du potentiel de la membrane (**Figure 3**). En effet, Les hydrocarbures cycliques agissent sur les ATPases, des enzymes connues pour être situées au niveau de la membrane cytoplasmique et entourées de molécules lipidiques. De plus, les hydrocarbures lipidiques peuvent fausser l'interaction lipide-protéine et l'interaction directe de composés lipophiles avec des parties hydrophobes de la protéine est également possible.

- La dernière mais non le moindre est la destruction du matériel génétique qui entraîne la mort de la bactérie. De plus, certaines études ont montré que les HE pouvaient également coaguler avec le cytoplasme et endommager les lipides, les protéines, les parois cellulaires et les membranes, ce qui pourrait entraîner une fuite de macromolécules et la lyse ultérieure. De plus, Certaines huiles essentielles stimulent la croissance des pseudo-mycéliums, démontrant qu'ils

peuvent agir sur les enzymes impliquées dans la synthèse des composants structurels de la bactérie (Yossa *et al.*, 2013 ; Saad *et al.*, 2013).



**Figure 3.** Sites d'une bactérie dans lesquels des composés naturels sont actifs (Burt, 2004).

Il est à noter que l'effet des HEs sur la croissance bactérienne dépendra du fait qu'il s'agisse de bactéries Gram-positives ou Gram-négatives, puisque La couche lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram-négatives agit comme une barrière pour les macromolécules et les composés hydrophobes tels que ceux présents dans les huiles essentielles (Pandey *et al.*, 2017).

La diffusion sur gélose est l'une des méthodes les plus utilisées et se caractérise par une grande simplicité et une rentabilité élevée. Dans cette technique, plusieurs réservoirs de l'agent antimicrobien (huile essentielle ou extrait) peuvent être utilisés. La technique la plus courante consiste à utiliser des disques en papier filtre (Chorianopoulos *et al.*, 2007), ou des cylindres en acier inoxydable répartis sur la surface du milieu gélosé. Des trous ou puits perforés dans le milieu gélose peuvent également être utilisés comme réservoirs de l'huile essentielle ou de l'extrait (Baratta *et al.*, 1998 ; Dorman et Deans, 2000 ; Abdollahzadeh *et al.*, 2014). Dans tous les cas, la quantité d'huile et le diamètre du réservoir sont des paramètres cruciaux. Le réservoir contenant l'agent antimicrobien à évaluer, après avoir été en contact avec le milieu inoculé et la période d'incubation requise, le diamètre de la zone transparente autour du réservoir (zone d'inhibition) est mesuré. Cette méthode a d'abord été conçue pour évaluer les propriétés antibiotiques d'extraits bruts. Alors que la méthode de diffusion en gélose peut être considérée comme très précise dans

la détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, plusieurs aspects moins favorables peuvent être soulignés, tels que les caractéristiques volatiles des composants de l'huile essentielle entraîneront leur perte, simultanément avec le solvant pendant l'incubation, tandis que les composés moins solubles peuvent ne pas diffuser de manière appropriée à travers le milieu de culture (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004 ; Balouiri *et al.*, 2016). Les paramètres à prendre en compte incluent le diamètre du disque ou du cylindre / trou, la quantité d'huile et le solvant ou l'émulsifiant utilisé. Ce dernier facteur semble différer de manière significative entre les études et plusieurs substances ont été utilisées notamment l'éthanol (Marino *et al.*, 2001 ; Vagi *et al.*, 2005 ; Zarai *et al.*, 2011), le Tween-20 (Macchia *et al.*, 2022), le Tween-80 (Lahlou *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2021), le méthanol (Djerrad *et al.*, 2015 ; Belkacem *et al.*, 2021) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Demirci *et al.*, 2015 ; Mitić, *et al.*, 2021). Une importance particulière doit être accordée à l'utilisation de concentrations sûres de solvant ou d'émulsifiant afin de ne pas perturber la croissance microbienne. Un autre aspect à prendre en compte est d'avoir un contrôle négatif (tel que de l'eau stérile ou un solvant).

Le degré d'activité de l'huile essentielle (ou l'extrait) est révélé par la taille de la zone d'inhibition qui est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition mentionnée (en mm ou en cm) et le diamètre du disque est généralement inclus. En raison de la nature simple de ce test et de la quantité réduite d'huile essentielle requise, l'utilisation de cette technique est généralement recommandée pour l'évaluation de nombreuses huiles essentielles (et/ou extraits), et elle met en évidence celles qui présentent la plus haute activité permettant de les soumettre davantage à une caractérisation en profondeur. Cette technique est également utilisée pour déterminer la susceptibilité d'une gamme significative d'espèces microbiennes à une huile essentielle particulière. Cependant, cette technique convient moins à des fins de quantification, telles que la détermination des valeurs de CMI et de CMB. Les techniques nécessitant une dispersion homogène dans l'eau (méthode de la dilution ; en gélose ou en milieu liquide) sont généralement appliquées afin de déterminer les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) par analyse de la courbe de croissance par comparaison avec la culture cultivée en l'absence de l'huile essentielle (culture témoin). Les paramètres CMI et CMB sont largement utilisés dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, mais des différences significatives ont été constatées quant à leur définition précise (Saad *et al.*, 2013; Balouiri *et al.*, 2016).

### **I.12.2 Activité antioxydant des huiles essentielles**

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) comprennent les radicaux libres et les espèces non-radicalaires. Les radicaux libres sont des molécules caractérisées par la possession d'un

électron non apparié qui essaie constamment de trouver un homologue (le superoxyde, l'oxyde nitrique et le radical hydroxyle (OH·) ; les oxydants non-radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) forment ultérieurement des radicaux libres dans les tissus par diverses réactions chimiques (Weidinger et Kozlov, 2015). Dans les organismes vivants, les ERO sont générés dans plusieurs systèmes cellulaires localisés sur la membrane plasmique, dans le cytosol, dans les peroxisomes et sur les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Di Meo *et al.*, 2016). La plupart des ERO sont produites par les cellules pendant le métabolisme, ils peuvent être produites par des sources exogènes d'ERO comme la pollution, le soleil, le tabac, certains polluants, les solvants organiques et les pesticides (Halliwell et Gutteridge, 2015). La surproduction de radicaux libres conduit à un stress oxydatif, un processus délétère qui peut causer des dommages aux structures cellulaires, y compris les lipides, les protéines et l'ADN ce qui peut être la cause de plusieurs maladies courantes et des maladies dégénératives telles que : l'Alzheimer, les arthrites, l'inflammation, le diabète, la maladie de Parkinson, l'athérosclérose et le SIDA (Shaaban *et al.*, 2012 ; Poprac *et al.*, 2017).

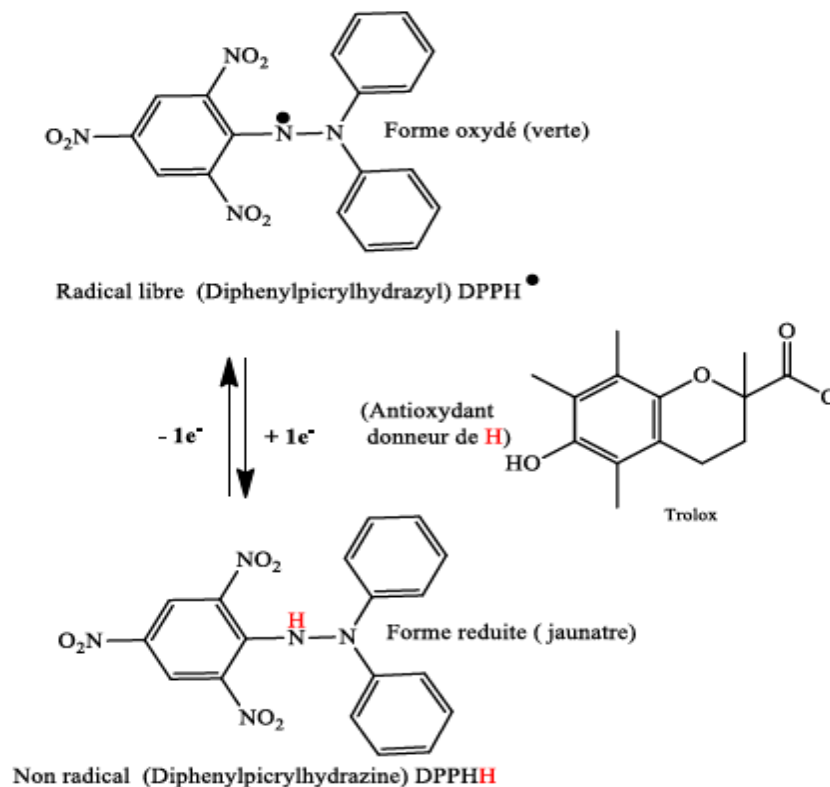
L'activité antioxydant des huiles essentielles peut être déterminée par de nombreuses techniques qui font intervenir en général la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (HE) (Oliveira, 2015). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon (Amorati et Foti, 2012).

L'activité antioxydant des huiles est également attribuée à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques et quelques monoterpènes : le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol, le néral, le citronellal, l'isomenthone, le menthol,  $\gamma$ -terpinène et l' $\alpha$ -terpinolène, le thymol, le *p*-cymène, l'eucalyptol et le carvacrol (Zhang, 2005 ; Edris, 2007 ; Aydin *et al.*, 2013). Et il semble être une tendance générale que les huiles essentielles qui contiennent des hydrocarbures monoterpéniques, des monoterpènes et/ou des sesquiterpènes oxygénés ont des propriétés antioxydants plus importantes (Nimes *et al.*, 2015). Les huiles essentielles ayant une importante capacité de piégeage des radicaux libres peuvent jouer un rôle important dans la prévention de certaines maladies, comme le dysfonctionnement du cerveau, le cancer, les maladies cardiaques et le déclin du système immunitaire. Ces maladies peuvent en effet résulter des dommages cellulaires causés par les radicaux libres (Ustun *et al.*, 2012 ; Ali *et al.*, 2015).

L'activité antioxydante des huiles essentielles peut être déterminée par nombreuses techniques qui font intervenir en général la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (huile essentielle). Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la réduction du 2,2-diphényl- 1- picrylhydrazyle (DPPH), l'inhibition de la



peroxydation de l'acide linoléique et blanchissement du  $\beta$ -carotène dans l'acide linoléique (Xie *et al.*, 2015; Olszowy et Dawidowicz, 2016 ; Liu *et al.*, 2022). La méthode de piégeage de radicaux libres est considérée comme étant la première approche pour évaluer le potentiel antioxydant d'un composé, d'un extrait ou d'une autre source biologique. C'est la méthode la plus simple, dans laquelle le composé ou l'extrait est mélangé avec la solution de DPPH et l'absorbance est évaluée après une période définie (Kulisic *et al.*, 2004). Le DPPH se caractérise par un radical libre stable (un électron non apparié sur un atome du pont d'azote). Du fait de cette délocalisation, les molécules ayant un radical ne forment pas des dimères, DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire, cette délocalisation donne lieu à une couleur violette foncée, mesurable par spectrophotométrie en solution d'éthanol à environ 520 nm. La présence d'une solution de DPPH avec une substance qui peut céder un atome d'hydrogène donne naissance à une forme réduite de DPPH associée avec une perte de la couleur violette, la couleur de la solution devient alors de plus en plus jaunâtre, la mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette de la solution (Gulcin, 2020).



**Figure 4.** Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant.

## II. Généralités sur le pin d'Alep

### II.1 Les Pinacées

La famille des Pinacées (*Pinaceae*), ou Abiétacées, est originaire des régions tempérées et dominante des forêts boréales, côtières et montagnardes de l'hémisphère nord (Farjon, 1990; Gernandt *et al.*, 2005). Elle compte 220 à 250 espèces réparties en 11 genres (Yang *et al.*, 2010 ; Ran *et al.*, 2018). Les Pinacées sont représentées par les espèces d'arbres les plus communément plantées à cause de leur croissance rapide, de leur résistance aux conditions les plus xériques, de leur aptitude à reconstituer les zones dégradées et à occuper les terrains nus (Zavala et Zea, 2004 ; Simpson, 2019). En Algérie, cette famille est représentée par trois genres : *Abies* (Sapin), *Cedrus* (Cèdre) et *Pinus* (Pin) (Quézel et Santa, 1963).

Le genre *Pinus* regroupe plus de 100 espèces, très répandues en Europe, en Afrique, en Asie et en Amérique (Molotkov et Patlaj, 1991). Le genre est subdivisé en trois sous-genres *Pinus*, *Ducampopinus* et *Cembrapinus*. L'espèce *Pinus halepensis* Mill. fait partie de la section *Halepensoïdes* qui est divisée en trois groupes parmi lesquels le groupe *halepensis* qui se caractérise par des feuilles à deux aiguilles et à cônes caducs (Nahal, 1962; Kaundun et Lebreton, 2010; Khouja *et al.*, 2021).

### II.2 Monographie du *Pinus halepensis* Mill.

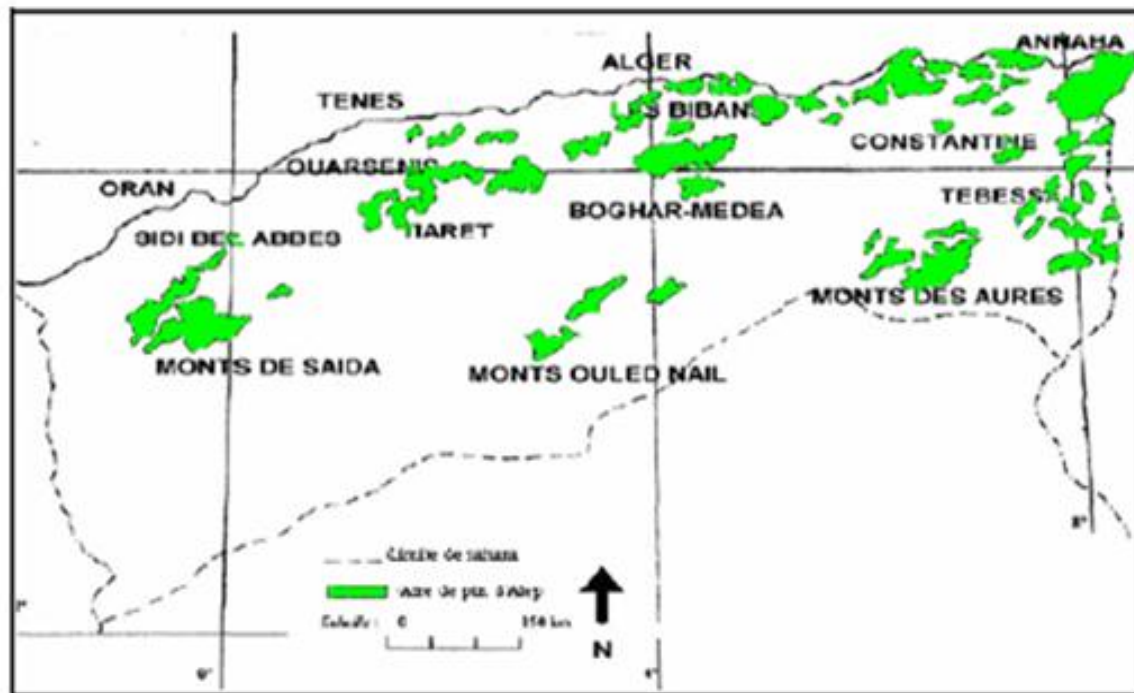
Le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) fut décrit pour la première fois par Duhamel, en 1755, sous le nom de *P. hierosolimitana*. Plus tard, Philip Miller l'a décrit, en 1768, sous le nom de *Pinus halepensis* Mill. (Nahal, 1962). C'est l'espèce la plus répandue dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen (Chambel *et al.*, 2013).

Le Pin d'Alep est un arbre toujours vert, de hauteur totale allant de 10 à 20 m selon le régime des précipitations de la région (Kadik, 1987), le tronc est tortueux, irrégulier et branchu. La longévité du Pin ne dépasse pas 150 ans (Seigue, 1985). Le feuillage est clair et léger, et les aiguilles sont très fines, réunies par deux, de 5 à 10 cm de long et de couleur vert-jaunâtre (Nahal, 1962). L'écorce, d'abord lisse et grise argentée, devient crevassée, épaisse et d'un brun foncé à l'âge adulte. C'est un arbre monoïque, il donne naissance tous les deux ans à des cônes ovoïdes longs de 8 à 12 cm, d'un rouge-brun luisant, à pédoncule très épais. Les graines sont abondantes environ 7 mm, mates, munies d'une aile 4 fois plus longue qu'elles, persistante qui permet leur dissémination rapide (Serre, 1973).

### II.3 Ecologie du pin d'Alep

*Pinus halepensis* se trouve à l'état spontané autour du bassin méditerranéen (Camarero *et al.*, 2020). Il est très répandu en Afrique du Nord surtout en Algérie et en Tunisie où il constitue les massifs les plus importants (Fkiri *et al.*, 2020).

En Algérie, le pin d'Alep est abondant et couvre environ 35% des surfaces forestières de l'Algérie (**Figure 5**), soit environ 800.000 ha (Bentouati *et al.*, 2006). Il se trouve dans toutes les étages avec une prédominance dans l'étage semi-aride (Guit, 2015).



**Figure 5:** Aire de répartition du *P. halepensis* en Algérie (Bentouati, 2006).

Sur le plan bioclimatique, le pin d'Alep se rencontre dans les différents étages. Toutefois, c'est dans l'étage semi-aride qu'il trouve son plein épanouissement. Il est présent partout, d'Est en Ouest, allant du niveau de la mer aux grands massifs montagneux du Tell littoral et de l'Atlas saharien (**Figure 5**). Sa plasticité et sa rusticité lui ont conféré un tempérament d'essence possédant un grand pouvoir d'expansion formant ainsi de vastes massifs forestiers (Bentouati, 2006).

La large distribution du pin d'Alep qui va du littoral au Sahara lui confère l'aptitude de végéter dans des tranches pluviométriques qui varient de 200 mm dans l'Atlas Saharien jusqu'à 1500 mm au littoral, il présente un optimum de développement entre 350 et 700 mm de précipitations annuelles (Quézel, 2000).

Du point de vue édaphique, le pin d'Alep est une espèce indifférente à la nature du sol. Elle préfère les substrats marneux et calcaro-marneux, ou les sols sont profonds permettant une bonne

pénétration du système racinaire (Schiller, 1982; Quézel, 2000). C'est une espèce qui craint l'hydromorphie et ne peut prospérer dans les dépressions où l'eau s'accumule, l'exposant ainsi à l'asphyxie racinaire (Bentouati, 2006).

## II.4 Les huiles essentielles du Pin d'Alep

### II.4.1 Rendement en huiles essentielles du *Pinus halepensis*

Plusieurs travaux ont étudié le rendement des huiles essentielles du pin d'Alep dans différentes régions (Tableau 1). Une grande variabilité du taux de rendement en huile essentielle a été observée. Cette variation dans le rendement peut être attribuée non seulement à la partie de la plante étudiée, mais également à l'emplacement géographique spécifique de cette espèce et l'altitude. Le taux le plus élevé est trouvé par Djerrad *et al.*, (2015) en Algérie et Amri *et al.*, (2013) en Tunisie, alors que les rendements les plus faibles sont obtenus par Bouzenna *et al.*, (2016), Tumen *et al.*, 2010 en Turquie et une région de Corse –France (Nam *et al.*, 2014).

**Tableau 1** : Rendements en huiles essentielles du *Pinus halepensis*.

Origine	Organe végétale	Altitude (m)	Rendement en %	Références
Algérie-Tlemcen	Aiguilles	197 - 983	0,42	Fekih <i>et al.</i> , 2015
	Cônes		0,18	
	Tiges		0,04	
	Racines		0,09	
Algérie-Tlemcen			0,3	Abi-Ayad <i>et al.</i> , 2011
Algérie- Djelfa, Batna et Tébessa	Partie aérienne	950 -1500	0,50-0,89	Djerrad <i>et al.</i> , 2015
Algérie- sidi Ferradj			0,5	Dob <i>et al.</i> , 2007
France-corse	Aiguilles		0,12-0,93	Nam <i>et al.</i> , 2014
Algérie- El kala et Souk ahras	Aiguilles		0,81 0,3	Sadou <i>et al.</i> , 2015
Turquie			0,20	Tumen <i>et al.</i> , 2010
Lybie	Aiguilles	125 -851	0,4-0,6	Mohareb <i>et al.</i> , 2017
Portugal	Aiguilles		0,23	Rodrigues <i>et al.</i> , 2017
Albanie			0,30	Taraj <i>et al.</i> , 2018
Tunisie	Aiguilles		0,85	Amri <i>et al.</i> , 2013
	Cônes		0,80	
	Racines		0,60	
Tunisie- Gafsa	Aiguilles	522	0,18	Bouzenna <i>et al.</i> , 2016
Tunisie			0,78	Dziri et Hosni, 2012
Egypte	Aiguilles cones		0,27ml/100g 14ml/100g	El-Settawy <i>et al.</i> , 2016
Maroc- Rebat	Aiguilles		0,44	Hmamouchi <i>et al.</i> , 2001
Maroc	Aiguilles		0,79	Lahlou, 2003
Italy-Asciano (Pisa)	Aiguilles		0,33	Macchioni <i>et al.</i> , 2003
	Tiges		0,28	
	Cônes		0,06	
Grèce	Aiguilles	139	0,44	Mitić <i>et al.</i> , 2019
Tunisie	Aiguilles		0,7	Khouidja <i>et al.</i> , 2021
	cônes		0,4	

### II.4.2 Composition chimique de l'huile essentielle de Pin d'Alep.

De nombreuses études ont été réalisées sur la composition chimique d'extraits et d'huiles essentielles de *P. halepensis*. Les terpénoïdes sont le groupe de métabolites secondaires les plus abondants dans les huiles essentielles de *P. halepensis* (Fernandez *et al.*, 2009 ; Chomel *et al.*, 2014 ; Kadri *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017; Benouadah *et al.*, 2019; Minervini *et al.*, 2020; Santonja *et al.*, 2019; Suárez-Vidal *et al.*, 2019).

Les huiles et les extraits méthanoliques, éthanoliques et hexaniques du *P. halepensis* sont riches en composés phénoliques (Meziti *et al.*, 2019, Abdalla *et al.*, 2014; Dhibi *et al.*, 2012; Suárez-Vidal *et al.*, 2019). Les huiles et les extraits sont aussi riche en hydrocarbures, aldéhyde, cétones, acétaldéhyde, cétones, alcools (Minervini *et al.*, 2020); et en protéines (Abbou *et al.*, 2020 ; Al-Ismail *et al.*, 2018).

La composition chimique de l'huile essentielle du Pin d'Alep est variable selon les organes (cône, aiguilles, tiges, rameaux et bourgeons) (Amri *et al.*, 2013 ; Fekih *et al.*, 2014). Cinquante-huit composés ont été identifiés dans l'huile d'aiguilles avec (Z)-caryophyllène et  $\beta$ -pinène comme constituants principaux ; 57 dans l'huile de cône avec  $\alpha$ -pinène et (Z)-caryophyllène comme composants principaux ; et seulement 27 dans l'huile de tige avec l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -myrcène comme composants principaux (Amri *et al.*, 2013).

La composition chimique de l'huile essentielle du Pin d'Alep est très variable selon les provenances, de nombreuses études ont été réalisées sur la composition chimique de l'huile essentielle de *P. halepensis* dans le monde (Tableau 2). Des composés sont à l'origine d'une grande diversité des compositions chimiques. Néanmoins, dans la majorité des cas, les 3 constituants discriminants sont l' $\alpha$ -pinène, le myrcène et le  $\beta$ -caryophyllène-E. Dans certains échantillons, le composé principal est nettement majoritaire, tandis que d'autres échantillons sont caractérisés par la présence de divers composés à des teneurs assez proches.

L'huile essentielles de *P. halepensis* est riche en composés volatiles tels que  $\beta$ -caryophyllène, myrcène et l' $\alpha$ -pinène (Bouyahya *et al.*, 2019). Par ailleurs, une étude réalisée en Corse a montré la présence d' $\alpha$ -pinène, myrcène,  $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène, et le 2-phenylethyl isovalerate comme composés majoritaires (Nam *et al.*, 2016).

Des populations de Grèce sont dominés par le (E)- $\beta$ -caryophyllène, accompagné de l' $\alpha$ -pinène et du cembrène (Roussis *et al.*, 1995). Les populations du Maroc sont constituées majoritairement d' $\alpha$ -pinène, de myrcène et du (E)- $\beta$ -caryophyllène (Hmamouchi *et al.*, 2001).

En Tunisie une étude a montré une composition chimique constituée principalement de  $\beta$ -élémane, d' $\alpha$ -humulène, d' $\alpha$ -pinène et du  $\beta$ -pinène (10,2 %) (Dziri et Hosni, 2012). L'huile essentielle des populations de la Turquie montre largement la présence du  $\beta$ -pinène et de l' $\alpha$ -

pinène (Ustun *et al.*, 2012). L'analyse des huiles essentielles de *P.halepensis* de Grèce a montré que les sesquiterpènes et les diterpènes étaient les classes les plus représentées, où le (E)-caryophyllène et le thunbergol sont les composés dominants (Mitić *et al.*, 2019). Ioannou *et al.*, (2014) ont montré que la composition des huiles de Grèce contiennent principalement le (E)- $\beta$ -caryophyllène, le myrcène et le cembrène. L'analyse des huiles essentielles *du P. halepensis* d'Egypte a donné l' $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -terpineol et caryophyllene comme composants majoritaires (El-Settawy *et al.*, 2016).

# CHAPITRE I: GENERALITES

**Tableau 2.** Composition chimique des huiles essentielles de *Pinus halepensis* dans le monde.

Localités	Grèce 1	Grèce 2	Grèce 3	Grèce 4	Italie 1	Italie 2	Maroc 1	Maroc 2	Maroc 3	Turquie 1	Turquie 2	Lybie 1	Lybie 2	Lybie 3	Corse 1	Corse 2	Corse 3	Egypte	Tunisie 1	Tunisie 2	Tunisie 3	Portugal
Auteur*	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L			M			N	O	P	Q	R
$\alpha$ -pinene	5,3	13,4	8	3,4	18,1	8,5	23,3	23,3	12	18,4	47,1	13,6	7,3	3,7	9,8	22,2	12,7	10,3	9,9	13,3	10,2	38,9
Sabinene	2,4	1,3	1,7	0,4	9,4	6,1	3,7	3,7	0,7	0,1	0	0	0	0	0,7	0,4	6,4	0	1,1	1,2	6,4	0
$\beta$ -pinene	0,8	1,1	1,9	0,3	2	1,1	3,1	3,1	0	46,8	2,8	19,9	7,9	1,1	0,8	1,6	1,7	0	10,7	5,1	11,6	2,3
Myrcene	4,9	6,6	15,1	5,2	27,9	12,5	16,3	16,3	23,8	1,3	6,3	3,8	2	0,8	4,3	3,5	38,5	0	9,52	20,5	0	16,7
$\Delta$ -3-Carene	0,3	6,9	0,5	1,1	1,7	0,9	0	0	0	0,9	1,7	1,9	0,4	2,8	0,4	2,1	1,5	7,6	0,8	1	0,8	16,8
p-Cymen	0	0	0	0	1,1	11,4	0,7	0,7	0,7	0	0,4	0	0	0	0,2	0,3	0,2	0	1,2	0,3	0,8	0
Limonene	0,5	5	1	0	1,1	1	1,3	1,3	1	2,3	0,8	0	0	0	0,4	0,8	0,9	0	1,9	1,6	0,6	0
Terpinolène	2,5	3,1	1,9	1	0	0	10,1	10,1	1,3	0,3	0	1,4	1,8	1,9	1,1	2,8	7,3	0	0	0	0	0
$\alpha$ -Terpinolene	0	3,1	0	0	9,9	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	5,4	6,7	0	0
Terpinen-4-ol	0,1	0,7	0,2	0,3	0	0	3,8	3,8	0	0	0	0,4	2,3	1,8	0,3	0,9	1,1	0	0,2	0,6	0,1	0
$\alpha$ -Terpineol	0	0,5	0	0,1	0,2	0	0,6	0,6	1,3	0,8	0,3	1	11,4	2	0,1	0,3	0,2	0	0,1	0,3	0	0
Geranylacetate	0	0,2	0	0	0,3	0,9	5,3	0	0	0	0	0	0	0	0,1	1,3	0,5	0	0	0	0	0
$\beta$ -Caryophyllene	11,9	19,1	19	32,2	16,4	26,3	14,2	14,2	28,1	9,2	11,2	8,45	24,85	27,23	49,7	30,5	16,2	40,8	0	0	0,1	6,3
$\alpha$ -Humullene	2	3,4	3,8	5,9	2,9	0	3,2	3,2	2,75	1,8	2,7	0	0	0	8	5	2,7	0	5,2	2,6	14,7	0
Germacrene-D	1,2	0,5	0	1	0,1	0	0	0	0,74	8,8	0,02	8,4	0,6	1,5	0,2	0,4	0,9	0	0	0	0,5	0
Methyl iso-eugenol	0	0	0	0	0	5,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phenylethyl-isovalerate	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7,6	8	2,7	5,7	3,3	0	0	0	0	0
Caryophyllene oxide	0	0	0,3	0,8	0,1	0	1,2	1,2	6,8	0,4	7,5	1,3	1,4	1,9	3,1	1,6	0,7	1,8	0	0,4	0,9	0
$\alpha$ -Cadinol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	1,4	1,9	0	0	0	0	0	6,1	0	0
Cembrene	33	7,6	6,5	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,9	0,6	2,5	0	0	0	0	0	0
Thumbergol	0	0	0	29,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,23	0	0	0	4	0	0	0	0
$\beta$ -elmene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22,1	0
Longifolene	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	0	0	0

\*: **A**-(Gallis *et al.*, 2012); **B**-(Roussis *et al.*, 1995) ; **C**-(Ioannou *et al.*, 2014) ; **D**-(Mitić *et al.*, 2019) ; **E**-(Macchioni *et al.*, 2003); **F**-(Vidrich *et al.*, 1988); **G**-(Hmamouchi *et al.*, 2001); **H**-(Lahlou, 2003) ; **I**-(Bouyahya *et al.*, 2019); **J**-(Ustun *et al.*, 2012); **K**-(Tumen *et al.*, 2010); **L**-(Mohareb *et al.*, 2017); **M**-(Nam *et al.*, 2016) ; **N**-(El-Settawy *et al.*, 2016); **O**-(Amri *et al.*, 2013b); **P**-(Amri *et al.*, 2014); **Q**-(Dziri et Hosni, 2012); **R**-(Rodrigues *et al.*, 2017).

# CHAPITRE I: GENERALITES

**Tableau 3.** Composition chimique des huiles essentielles de *Pinus halepensis* en Algérie.

Localités	Sidi Feredj	Sidi Feredj	Djelfa	Saïda	Djelfa	Tissemsilet	Djelfa	Djelfa	Djelfa	Djelfa	Djelfa	Batna			Tebessa		Telemcen	Ghazaouet
Auteurs**	A	B	C		D						E			F		G	H	
$\alpha$ -pinene	1,23	0,7	5,2	6,4	18	6,7	11,5	12,3	11,1	10,9	13,7	8,5	7,6	17,2	21,4	22	12,2	0
Sabinene	1,23	0,1	0,8	0,7	3	7	1,5	0,1	0	0	0	1,5	0	0,9	1,2	1,8	4,2	0
$\beta$ -pinene	0,23	1	5	5,6	2	2	0,6	0,5	0,9	0,2	0,6	1,7	1,9	0,6	3,1	1,6	1,9	0
Myrcene	3,07	0,3	0,2	0,5	3	8,7	24,1	22,1	21,7	20,2	21,6	16,7	17,1	10,5	12,7	13,9	25,2	0
$\Delta^3$ -carene	0,15	0,2	0	0,4	0	0,1	0,4	0,9	0,8	0,8	2,6	1,9	2,7	0	1,3	1,3	1,6	0
p-cymen	0	0	0	0	3	0,3	10,6	11,4	11,2	11,9	10,5	14,6	13,7	10,2	9,7	9,3	0,6	0,55
Limonene	0	0,1	0,1	0,1	0	0,8	0,5	0,5	0	0,6	0,6	1,4	3,1	2,7	0,8	1,3	0,9	0
$\beta$ -ocimene cis	0	0	0	0	0	0	0	0,7	0,9	0,5	0	2,5	2,7	1,4	0	1	0,4	0
$\beta$ -ocimene trans	0,21	0,1	1,3	1,2	0	2	0	0,9	2,3	0,4	0	3,6	4,2	1,7	0	1,5	1,4	0
$\gamma$ -terpinene	0	0	0,3	0,3	0	1	1,1	0,2	0,8	0,2	0,5	0,6	0,4	1,5	0,9	1,3	1,4	0
Terpinolene	0	0,8	0,1	2,4	0	0	0	1	0	0,1	0	5,8	2,3	4,6	0	1,1	8,3	0
$\alpha$ -terpinolene	0,13	0	0	0	0	0,2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Linalool	0	0,1	0	0	2	0	0	0	0,9	0	0	0	0	1,2	1,3	0,8	0,4	0
Terpinen-4-ol	0	0,1	0	0,6	1	0	0	0,4	0,9	0,1	0,9	3,4	1,5	1,5	0	0	4,2	0,37
$\beta$ -caryophyllene Z	40,31	19,8	25,8	25	0	0	25,9	25,8	24,4	24,8	24,4	15,6	16,7	20,3	22,5	21,4	0	0
$\beta$ -caryophyllene E	0	0	0	0	3	7,1	0	0	0,7	0,7	0,1	0	0,5	1,8	1,2	1,4	10,9	0
Aromadendrene	7,1	7	0	5	0	0	0,4	0,3	0,7	0,4	0,9	1,2	1,6	1,5	0	0,9	0	0
$\alpha$ -humullene	7,92	6,2	0,6	10,5	1	2,8	0,7	5	0,2	0,6	0,8	1,9	1,5	0,8	1,2	1,7	2,1	3,66
Germacrene D	0,49	0,1	2,2	0,8	0	0,2	0,3	0,5	0,6	0,7	0,9	2,9	1,4	1,8	1,9	1,4	0,1	0
Phenylethyl 2-methyl-butyrat	0	0	0	0	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phenylethyl-isovalerat	0	0	0	0	8	7,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,78
Caryophyllene oxide	0	0	0	0	0	0	12,4	12,5	11,4	11,8	10,5	0	0	0	0	0	0,8	48,15
Thumbergol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,33
Totale	62,07	36,6	41,6	59,5	54	47,3	90	95,1	88,8	85,2	89,5	83,8	78,4	78,4	78	82,3	65,7	66,84

\*\* : A-(Dob *et al.*, 2005); B-(Dob *et al.*, 2007); C-(Tazerouti *et al.*, 1993); D-(Djerrad *et al.*, 2015); E-(Djerrad *et al.*, 2015); F-(Djerrad *et al.*, 2015); G-(Fekih *et al.*, 2014); H-(Abi-Ayad *et al.*, 2011).



L'analyse des huiles essentielles de plusieurs régions d'Algérie montre que l'huile essentielle du pin d'Alep dans la région de Djelfa, est dominée par l' $\alpha$ -pinène (17,6 %), le 2-méthylbutyrate de phényléthyle (10,3 %) et l'isovalérate de 2-phényléthyle (8,4 %) (Djerrad *et al.*, 2015). Dans la région de Tissemsilet, l'huile essentielle est dominée par le myrcène (8,6 %) suivi de l'isovalérate de 2-phényléthyle (7,4 %) et du (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (7,1 %) (Tazerouti *et al.*, 1993).

Dans les régions de Sidi Feradj, Djelfa et Saïda, la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles est dominée par le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène, suivi de l' $\alpha$ -humulène, l'aromadendrène, l' $\alpha$ -pinène et du  $\beta$ -pinène (Dob *et al.*, 2007). L'huile essentielle des aiguilles provenant de la forêt de Sidi Feradj (Nord de l'Algérie) présentent le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène comme composant majoritaire (Dob *et al.*, 2005). Les échantillons de la forêt de Ghazaouet, contiennent majoritairement de l'oxyde de caryophyllène et du thumbergol (Abi-Ayad *et al.*, 2011). Une étude réalisée sur l'huile essentielle de 10 échantillons du *P. halepensis* de la région de Tlemcen a montré que la composition chimique de l'huile de cette espèce contient deux groupes : l'un riche en myrcène,  $\alpha$ -pinène, terpinolène et l'isovalérate de 2-phényléthyle, l'autre dominé par le myrcène, l' $\alpha$ -pinène, et le (*E*)- $\beta$ -caryophyllène (Fekih *et al.*, 2014). Djerrad *et al.*, (2015) ont montré que la composition chimique des huiles essentielles du *P. halepensis*, de plusieurs régions d'Algérie, est constituée principalement d' $\alpha$ -pinène, de myrcène, p-cymène, (*Z*)-  $\beta$ -caryophyllène et d'oxyde de caryophyllène.

### II.5 Propriétés biologiques des huiles du *P. halepensis*

Les espèces du genre *Pinus* possèdent des propriétés thérapeutiques associées à leurs compositions chimiques. En effet, plusieurs études ont révélé la présence de métabolites secondaires douées d'activités biologiques (Basholli-Salihu *et al.*, 2017; Mitić *et al.*, 2018; Rigane *et al.*, 2019; El Omari *et al.*, 2021). Les huiles essentielles et les extraits de différentes parties végétales du pin d'Alep présentent des activités biologiques importantes ; activité anticancéreuse (Petri *et al.*, 2012 ; Kadri *et al.*, 2014; Rigane *et al.*, 2019; Dakhlaoui *et al.*, 2021) ; Avtivité anti-inflammatoire (Meziti *et al.*, 2019; Kotroni *et al.*, 2019), antitoxique (Berroukche *et al.*, 2014 ; Bouzenna *et al.*, 2016 ; Sharma *et al.*, 2020) ; insecticide (Mitić *et al.*, 2019 ; Pavela *et al.*, 2021), herbicide (phytotoxique) (Hamrouni *et al.*, 2014), cicatrisante (Süntar *et al.*, 2012), activité larvicide (Mitić *et al.*, 2019) et activité anticholinestérase (Khouja *et al.*, 2020), antifongique (Amri *et al.*, 2013 ; Hamrouni *et al.*, 2015; Eryilmaz *et al.*, 2016 ; Mohareb *et al.*, 2017 ; Al-Bazaz *et al.*, 2018 ; Mohamed *et al.*, 2020), antioxydante (Djerrad *et al.*, 2015 ; Djerrad *et al.*, 2017 ; Bouyahya *et al.*, 2019 ;

Meziti *et al.*, 2019 ; Aidi Wannes *et al.*, 2020 ; Khouja *et al.*, 2020) et antibactérienne (Ghanmi *et al.*, 2007; Hmamouchi *et al.*, 2001; Mitić *et al.*, 2019; Raho, 2014; Fekih *et al.*, 2014; Mohareb *et al.*, 2017 ; Ashmawy *et al.*, 2020; Bouyahya *et al.*, 2019 ; El Omari *et al.*, 2021 ; Aloui *et al.*, 2021 ; Aidi Wannes *et al.*, 2021).

### II.5.1 Activités antibactériennes de l'huile essentielle de *Pinus halepensis*

Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de *P. halepensis* ont été démontrées par plusieurs travaux (Ghanmi *et al.*, 2007; Hmamouchi *et al.*, 2001; Mitić *et al.*, 2019; Raho, 2014; Fekih *et al.*, 2014; Mohareb *et al.*, 2017 ; Ashmawy *et al.*, 2020; Bouyahya *et al.*, 2019a ; Aloui *et al.*, 2021 ). Dahham *et al.*, (2015) ont étudié l'activité antibactérienne contre six souches de référence en utilisant un test de diffusion et de micro-titration de l'agar. Les résultats ont révélé que l'huile essentielle de *P. halepensis* possède des effets inhibiteurs remarquable sur tous les microorganismes testés mais les souches les plus sensibles sont *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, l'effet antibactérien est probablement attribué à la richesse de cette huile essentielle en  $\beta$ -caryophyllène.

Ses propriétés antifongiques (Ghanmi *et al.*, 2007 ; Amri *et al.*, 2013 ; Hamrouni *et al.*, 2015; Eryilmaz *et al.*, 2016 ; Mohareb *et al.*, 2017 ; Al-Bazaz *et al.*, 2018 ; Mohamed *et al.*, 2020) ont également été démontré. Les travaux de Hamrouni *et al.*, (2015) réalisés sur l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* montrent une activité antifongique contre 10 espèces fongiques Agricole : *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium. Subglutinans*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium nygamai*, *Rhizoctonia* sp, *Microdochium nivale var nivale*, *Alternaria* sp et *Bipolaris sorokiniana*.

Les travaux d'Abi-ayad *et al.*, (2011), ont montré que les huiles essentielles de *pinus halepensis* ont un effet fongicide contre l'*Aspergillus flavus*, l'*Aspergillus Niger*, le *Fusarium oxysporum*, le *Rhizopus stolonifer*.

Ghanmi *et al.*, (2007), ont montré le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de gemme des pins (essence de térébenthine) contre les micro-organismes connus pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité : *Penicillium parasiticus* et *Aspergillus Niger*. L'essence de térébenthine a montré son efficacité contre les champignons, ceci est attribué à sa richesse en pinènes.

### II.5.2 Activités antioxydants de l'huile essentielle de *Pinus halepensis*

Les huiles essentielles et les extraits d'écorce, d'aiguilles ou de cônes ont montré des activités antioxydants (Djerrad *et al.*, 2015 ; Djerrad *et al.*, 2017 ; Bouyahya *et al.*, 2019 ; Kotroni *et al.*, 2019; Meziti *et al.*, 2019 ; Aidi Wannes *et al.*, 2020). L'huile essentielle de *Pinus halepensis* montre son efficacité à neutraliser les radicaux libres via différents mécanismes *in vitro*, en utilisant trois méthodes expérimentales : test de DPPH, ABTS et FRAP (Bouyahya *et al.*, 2019).

L'effet antioxydant de *Pinus halepensis* est confirmé sur le globule rouge des souris qui représente un bon modèle cellulaire pour l'étude de stress oxydant. En effet, l'extrait méthanolique de *Pinus halepensis* inhibe la peroxydation lipidique, ainsi que l'hémolyse induite par l'agent oxydant AAPH, ces effets peuvent être dû à la teneur élevée de l'extrait en composés phénoliques et flavonoïdes (Meziti *et al.*, 2019).

Une étude menée par Djerrad *et al.*, (2015) sur différentes populations de pin d'Alep de différentes zones Algériennes (Djelfa, Batna, Tebessa) a révélé la bonne capacité antiradicalaire des HEs. Le travail publié par Aidi Wannes *et al.*, (2020) montre que l'HE de *pinus halepensis* de deux régions tunisiennes possède une bonne activité antioxydant.

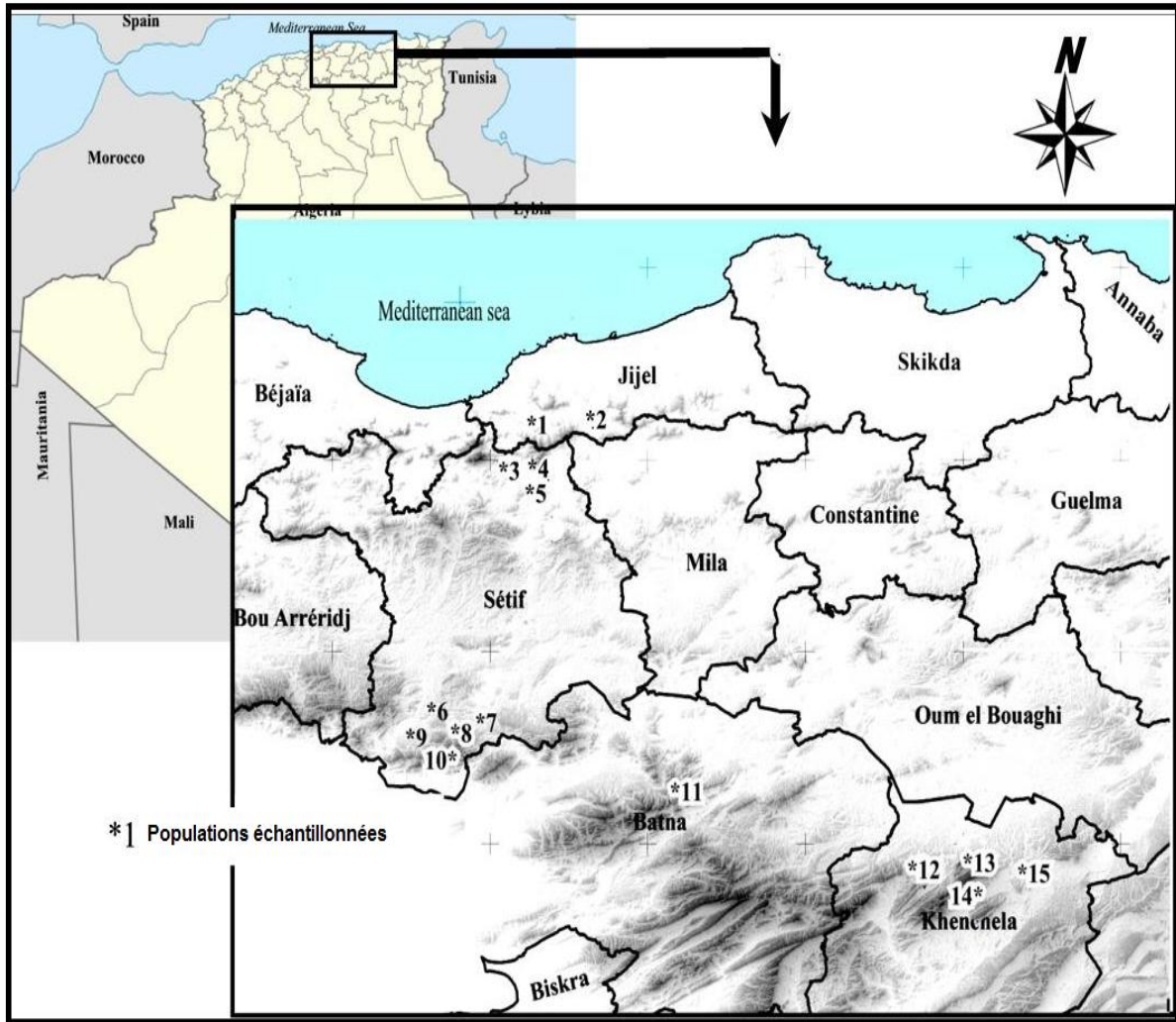
*CHAPITRE II :*

*MATERIEL  
ET METHODES*

I. Matériel végétal

I.1 La récolte des plantes

L'étude a été réalisée sur les parties aériennes de *P. halepensis* collectées en période de floraison, en Novembre 2016. Cinq sites d'échantillonnage dans le Nord d'Algérie Boutaleb (Sud de Sétif), Babor (Nord de Sétif), la forêt d'Ouled Yaakoub (Wilaya de Khenechela), la forêt de Seriana (Wilaya de Batna) et Jijel (Bir ghzala et Iraguene) (**Figure 6**).



**Figure 6.** Zones d'échantillonnage des populations du *Pinus halepensis*

Au total, quinze populations ont été échantillonnées, les coordonnées géographiques des stations étudiées sont mentionnées dans le **tableau 4**.

## CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

**Tableau 4.** Localisation des stations d'échantillonnage du *Pinus halepensis*.

	Stations	Populations	Altitude (m)	Coordonnées géographiques (latitude, longitude)
1	Jijel	Birghzala	947	36°36' 48,75"N ; 5°30' 38,56"E
2		Iraguene	767	36°35' 10,32"N ; 5°34' 51,24"E
3	Nord de Sétif (Babor)	Djouada	1568	36°30' 18,90"N ; 5°29' 50,70"E
4		Daassa	861	36°29' 23,64"N ; 5°32' 21,48"E
5		Beni Bezez	1133	36°19' 69,03"N ; 5°41' 50,87"E
6	Sud de Sétif (Boutaleb)	Ain laaneb	1433	35°44' 25,54"N ; 5°21' 04,93"E
7		Bouriache	0982	35°43' 09,89"N ; 5°13' 45,34"E
8		Cheabet Thniat Khrouf	1296	35°42' 06,27"N ; 5°20' 55,77"E
9		Chikda	1259	35°42' 56,19"N ; 5°25' 05,09"E
10		Sidi amor	1054	35°42' 16,14"N ; 5°22' 03,08"E
11	Batna	Seriana	1026	35°39' 48,90"N ; 6°11' 53,30"E
12	Khanechela (Ouled Yakoub)	Boussenane	1178	35°22' 51,60"N ; 6°54' 05,35"E
13		Troud	1160	35°23' 53,19"N ; 6°57' 02,17"E
14		Tafrent	1562	35°22' 31,72"N ; 6°57' 30,84"E
15		Tizi yaala	1224	35°25' 06,33"N ; 6°83' 23,72"E

L'identification botanique des échantillons a été réalisée par des botanistes du département d'Ecologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université de Sétif, selon les clés de déterminations de la flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Quézel et Santa, 1962-1963).

### I.2 Préparation des échantillons

Après récolte du matériel végétal, nous avons procédé au séchage à la température ambiante (20-25°C) pendant environ un mois à l'air libre, ensuite, les échantillons ont été récupérés dans des sacs propres et stockés à l'abri de la lumière et d'humidité.

## II. Méthodes

### II.1 Extraction et caractérisation des huiles essentielles

#### II.1.1 Hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles des parties aériennes du pin d'Alep a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif d'extraction de type Clevenger. L'extraction a été

réalisée au laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles (VRBN) de l'Université de Sétif 1.

Une quantité de 300 g de masse végétale a été immergée dans un ballon en verre à demi rempli d'eau (3 litres d'eau distillée), le mélange est porté à ébullition avec un chauffe-ballon pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes d'huile ainsi produite s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau distillée. En raison de la différence de densité l'huile surnage à la surface d'l'eau. Cette opération dure trois heures à partir du début d'ébullition. L'huile ainsi obtenue est récupérée en présence de sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et séchée avec du sulfate de sodium anhydre et conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5°C). Le montage de l'hydro-distillation est représenté ci-dessous.

### II.1.2 Calcul du Rendement en l'huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est déterminé par le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale utilisée, selon la formule suivante :

$$\text{Rendement \%} = [M/M_0] \times 100$$

Où :

M : masse d'HE en gramme ;

$M_0$  : masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

### II.1.3 Analyse Chromatographique des huiles essentielles

L'analyse chromatographique des huiles essentielles est réalisée à l'Ecole d'Ingénieur SIGMA, Institut de Chimie, équipe Chimie Organique et Médicinale, Clermont-Ferrand (France).

La chromatographie en phase gazeuse (Hewlett-Packard CPG/FID 7890) couplée à un appareil de chromatographie en phase gazeuse (CPG/MS 7890/5975C) a été réalisé afin de séparer et de quantifier les composés chimiques de l'huile essentielle de pin d'Alep. Le couplage à la spectrométrie de masse nous a permis, de déterminer les composés en se basant sur la masse des composants. Le mode opératoire de CPG-MS est effectué à l'aide d'une colonne polaire (DB5 MS : 40m 0.18mm 0.18 $\mu\text{m}$ ), soumis à un programme de four de 50°C pendant (5 min) à 5°C/min jusqu'à 300°C, l'hélium comme gaz porteur (1,0 ml/min), et un injecteur en mode split (1 :30) de température de 280°C avec un split de 1/100. Le spectromètre de masse a

fonctionné avec une énergie d'ionisation (EI) à 70 eV, multiplicateur d'électrons de 2500 V et une température de la source d'ions de 180°C.

### **II.1.4 Identification des composés chimique**

L'identification des composants a été basée sur la comparaison des temps de rétention et de leurs spectres de masse avec ceux de la banque de spectres de masse de l'Institut National Américaine des Normes et de la Technologie (Stein *et al.*, 2002) et ceux décrits par Adams (2007) ainsi que sur la comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des composés authentiques ou avec des valeurs de la littérature.

## **II.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielle**

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P. halepensis* a été faite par un test de diffusion sur disque comme décrit par Nicoletti *et al.*, (2012), avec certaines modifications suivant les directives de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2018).

### **II.2.1 Espèces bactériennes testées**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *P. halepensis* a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur huit souches bactériennes testées qui appartiennent à l'American Type Culture Collection ATCC, résistantes aux antibiotiques : *E-coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Salmonella entericspp. arizonae* CIP 81-3, *Listeria innocua clip* 74915, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, et *Bacillus cereus* ATCC 11778. Les espèces bactériennes proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger et de M'Sila et du laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Sétif Abdenour Sâadana.

### **II.2.2 Stérilisation du matériel**

L'eau distillée, les tubes à essai utilisés dans la préparation des suspensions bactériennes (Inoculum) ainsi que dans la préparation des dilutions de nos échantillons, ont été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

### **II.2.3 Milieu de culture**

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation du milieu de culture Mueller Hinton agar (MH) qui a pour provenance (Fluka) ainsi que le bouillon nutritif et la gélose nutritive qui proviennent de l'institut Pasteur d'Alger.



### II.2.4 Préparation de l'inoculum et ensemencement

Les disques d'antibiotiques utilisés comme témoin positif pour toutes les bactéries sont Gentamicine (10 $\mu$ g), Ampicilline (10 $\mu$ g), Eurythromycine (15 $\mu$ g), Amoxicilline (25 $\mu$ g), Meropenem (10 $\mu$ g), Oxacilline (1 $\mu$ g), Cephalozine (30 $\mu$ g).

Des disques stériles de six mm sont placés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie, et ils sont ensuite imprégnés de concentrations croissantes des huiles repris avec Dimethylsulfoxyde (DMSO) à raison de 10  $\mu$ l par disque (1 :1, 1 :2, 1 :4 et 1 :8 v/v DMSO qui est utilisé comme contrôle négatif). Ainsi, les huiles diffusent à partir du disque au sein de la gélose et y déterminent une zone d'inhibition autour des disques (inhibition de la croissance bactérienne) en fonction de la concentration.

Les bactéries ont été cultivé dans des boîtes de Pétri, solidifiée et séchée sur la gélose Mueller Hinton (MHA), en aérobiose 37°C pendant 24h. Par la suite deux colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis émulsionnées dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl), puis agiter jusqu'à obtenir une suspension bactérienne homogène.

La densité est ajustée au standard McFarland 0,5 (soit 108 UFC/ml) pour cela la concentration bactérienne des différentes solutions est évaluée par turbidité est exprimée par la mesure des densités optiques de 0.08 à 0.10 à une longueur d'onde de 625 nm (Donay *et al.*, 2007).

### II.2.5 Dépôt de disque et lecture

Après incubation, l'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (ou les diamètres des halos clairs tout autour des disques). Tous les tests ont été réalisés en triple. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus l'espèce bactérienne est sensible à l'huile essentielle (Fauchère et Avril, 2002). La sensibilité des bactéries aux huiles essentielles a été classée en cinq groupes en fonction du diamètre des halo d'inhibition selon l'échelle de Ponce *et al.*, (2003) en :

Espèce non sensible (-) lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 8mm. Espèce Sensible (+) lorsque le diamètre de la zone d'inhibition compris entre 9 et 14mm). Espèce très sensible (++) lorsque le diamètre de la zone d'inhibition compris entre 15 et 19 mm. Espèce extrêmement sensible (+++) lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 20mm (Ponce *et al.*, 2003).

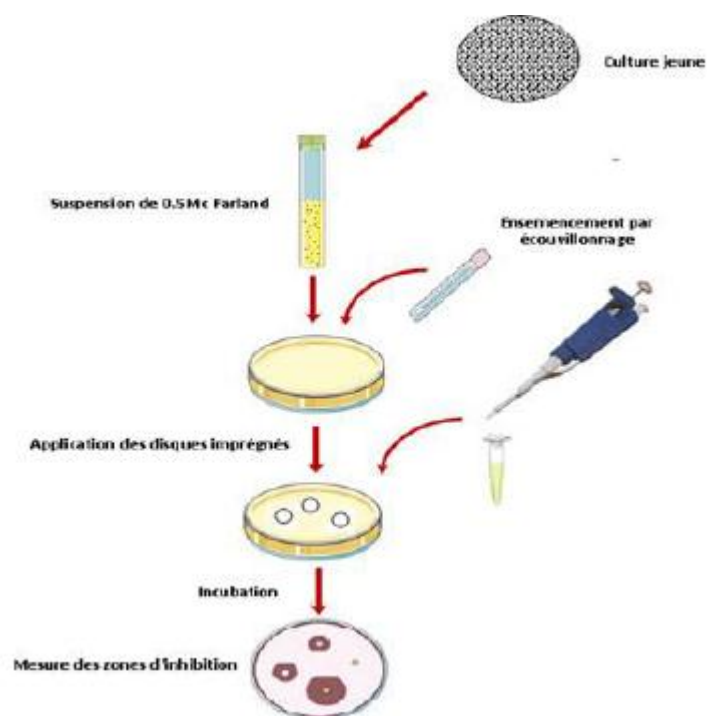


Figure 7. Technique de diffusion sur gélose par disques

### II.3 Evaluation de l'activité antioxydant par DPPH

Nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 512 à 520 nm.

Le test consiste à mettre le radical DPPH• (Couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH (2,2- diphenyl -1- picrylhydrazyl) est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Sanchez-Moreno, 2002). L'intensité de la couleur est représentative de la capacité des composés de l'huile essentielle à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique. Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur le pouvoir anti radicalaire direct de nos huiles essentielles.

La forme réduite (diphénylpicryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (Parejo *et al.*, 2002).

L'évaluation de l'activité antioxydante des échantillons des huiles essentielles de *P. halepensis* a été effectuée par la méthode du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), selon le protocole décrit par (Olszowy et Dawidowicz, 2016).

Brièvement, 100 µl de chacune des solutions méthanoliques des HE testées à différentes concentrations sont mélangées avec 2,9 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%).

Après agitation par un vortex, le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30 min à la température de laboratoire et la densité optique a été mesurée avec un spectrophotomètre (SECOM-M - Prim'Light) à 517 nm. Le contrôle négatif contient uniquement la solution de DPPH et le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydant de référence l'hydroxytoluènebutylé (BHT) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test. Tous les essais ont été effectués en triple.

L'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [1 - (\text{Abs test} / \text{Abs contrôle})] \times 100$$

Abs test : absorbance de l'échantillon.

Abs contrôle : absorbance contrôle négatif.

La cinétique des réactions des HE et du BHT avec le DPPH a été inscrite à chaque concentration examinée. Les concentrations en HE et en BHT, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracé à la fin des réactions afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50%. Tous les tests ont été effectués en triplicata et les valeurs d'IC50 ont été reportées en tant que moyenne  $\pm$  SD. Les IC50 sont calculées à partir des courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles.

### II.4 Analyse statistique des données

#### II.4.1 Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode statistique d'analyse des données (initialement de statistique descriptive) qui consiste à rechercher les directions d'espace qui représentent le mieux les corrélations entre les variables aléatoires. Donc le but est de comprendre et de visualiser comment les effets de phénomènes a priori isolés se combinent.

Lorsqu'on veut compresser un ensemble de -N variables aléatoires, les N premiers axes de l'ACP est un meilleur choix, du point de vue de l'inertie expliquée. Si on décide de ne retenir que les deux premiers axes de l'ACP, on pourra alors projeter notre nuage sur un plan, et le visualiser. Même si l'ACP est majoritairement utilisé pour visualiser des données, il ne faut pas oublier que c'est aussi un moyen de décorrélérer les données, les axes qui ne sont pas utilisés c'est de l'information perdue, c'est une classification des données en amas (clusters) corrélés.

### **II.4.2 Analyse UPGMA**

L'UPGMA est le nom d'un algorithme destiné à la construction d'un arbre phylogénétique. Cette méthode permet la transformation d'une matrice de distances (entre différents organismes, populations, ou séquences de nucléotides) en un arbre enraciné. C'est la méthode la plus simple de construction d'arbre. L'origine elle a été développée pour construire les phonogrammes taxonomiques (arbres qui reflètent les similitudes phénotypiques entre unités taxonomiques), mais elle est employée aussi pour construire les arbres phylogénétiques si les taux d'évolution sont approximativement constants parmi les différentes lignées. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel *STISTICA 10*.

### **II.4.3 Analyse de la variance**

L'évaluation des activités antibactérienne et antioxydant, ont été réalisés par une analyse de variance ANOVA à trois critères de classification afin de comparer les moyennes d'un groupe témoin avec les autres groupes ou de la comparaison des pourcentages lorsqu'il y a plus de deux valeurs à comparer. Les différences entre les moyennes sont considérées significatives pour des valeurs  $p < 0,05$ .

### **II.4.4 Test de désirabilité**

Dans cette étude, les variables des résultats obtenus ont été transformés aux valeurs de désirabilité (test de désirabilité). L'opportunité est définie de telle sorte que si une réponse dépasse les limites acceptables, la valeur de désirabilité correspondante sera 0 et représente une réponse complètement indésirable. Si la réponse est sur la cible, la valeur de désirabilité sera égale à 1 et représente la réponse la plus souhaitable.

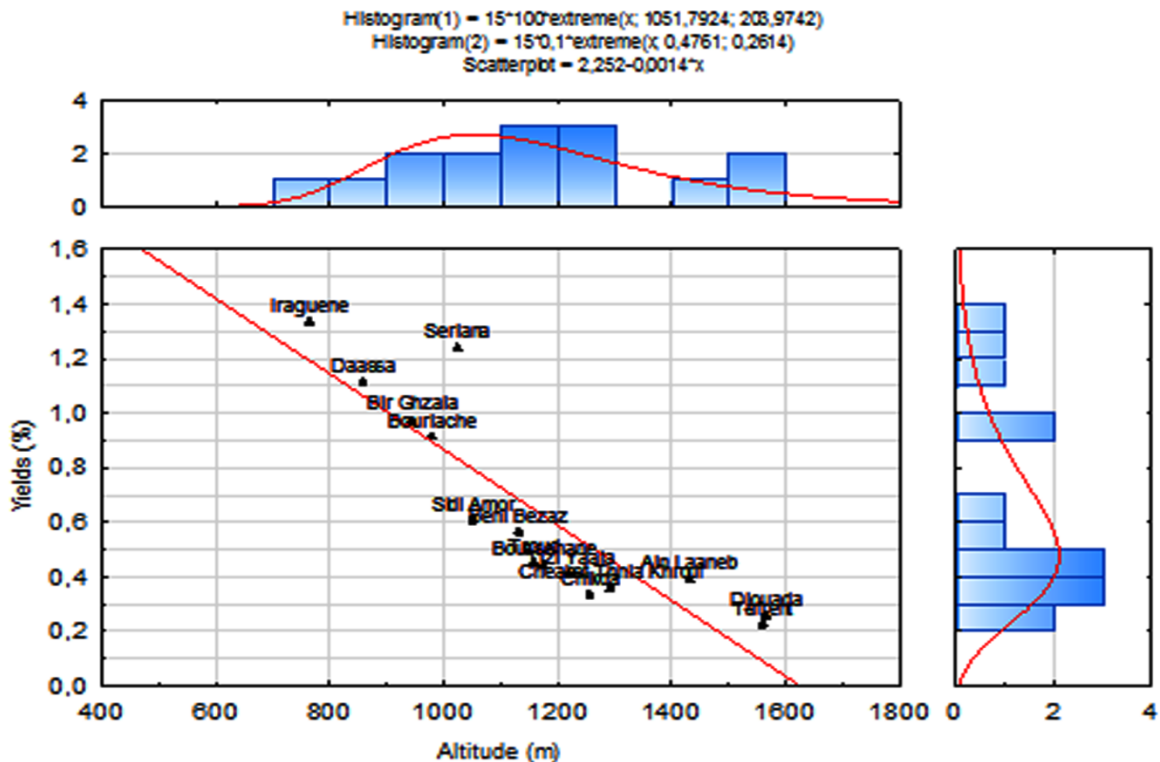
*CHAPITRE III :*

*RESULTATS*  
*ET DISCUSSION*

## I. Rendement en huiles essentielles de *Pinus halepensis*

Les extractions par hydrodistillation des parties aériennes de *P. halepensis* ont été réalisées sur 15 populations algériennes. Ces extractions ont fourni des huiles essentielles ayant des colorations variables allant du jaune clair au transparent mais toujours avec une très forte et persistante odeur caractéristique.

Les 15 populations étudiées ont présenté des rendements variables en huiles essentielles, allant de 0,22 % à 1,34 %. Le plus haut rendement en huile essentielle 1,34% a été observé chez la population d'Iraguene dans la station de Babor (Nord de Sétif) (altitude 861m) tandis que le rendement le plus bas 0,20% est obtenu chez la population de Tafrent dans la station d'Ouled Yakoub (Khenchela) (altitude 1562 m) (**Figure 8**). Les plus hauts rendements ont été obtenus chez les populations de Daassa, Iraguene, Babor et Seriana à Batna, toutes ces stations sont situées dans les régions à plus faible altitude.



**Figure 8.** Rendements en huiles essentielles de *Pinus halepensis*.

Les populations Bourlache, Cheabet theniat khrouf, Ain Laaneb, Sidi Amor et Chikda récoltées de la même localité (Boutaleb), présentaient une variabilité importante de rendements, s'étendant de 0,33 % à 0,91 %. En se basant sur le rendement des huiles essentielles, les quinze provenances sont classées dans l'ordre suivant : Iraguene > Seriana > Daassa > Bir ghzala > Bourlache > Sidi amor > Beni bezaz > Troud > Tizi yaala > Ain laaneb > Cheabet Thniat Khrouf > chikda > Djouada > Tafrent.

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

En comparant séparément les rendements des huiles essentielles obtenus au cours de notre étude avec ceux rapportés dans la littérature, nous avons fait les constats suivants. Nos résultats sont similaires et proches à celles rapportées chez les populations Algériennes : Dob *et al.*, (2007) à sidi Ferradj (0,5%), Abi-Ayad *et al.* (2011) à Tlemcen (0,3%), Fekih *et al.*, (2015) à Tlemcen (entre 0,09% et 0,42%), Djerrad *et al.*, (2015) à Djelfa, Batna et Tébessa (0,5% et 0,89%), Sadou *et al.*, (2015) à El kala et Souk Ahras (0,3% et 0,81%). Le rendement de nos populations en huiles essentielles est plus élevé que celui enregistrés par Amri *et al.*, (2013) et Bouzenna *et al.*, (2016) en Tunisie, Tumen *et al.*, 2010 en Turquie et une région de Corce –France (Nam *et al.*, 2014) qui représentent les taux de rendements les plus faibles.

En fonction de l'altitude, les rendements en huile essentielle sont très variables, diminuent quand l'altitude augmente. Nos résultats concordent avec ceux des populations des îles de Corse qui ont montré des variations aussi élevées (Nam *et al.*, 2014). Des conclusions semblables ont également été faites sur des populations de Djelfa, Batna et Tébessa à des altitudes différentes (Djerrad *et al.*, 2015) ; Tlemcen (Fekih *et al.*, 2015) et Lybie (Mohareb *et al.*, 2017 ; Elkady *et al.*, 2021).

Bien que les métabolites secondaires des plantes médicinales et aromatiques soient contrôlés de manière conventionnelle par leurs génotypes, leur biosynthèse est également fortement influencée par des facteurs environnementaux. Cela signifie que des facteurs environnementaux biotiques et abiotiques affectent les paramètres de croissance, le rendement en huile essentielle et les constituants de ces huiles (Verma et Shukla, 2015 ; Yang *et al.*, 2018 ; Khare *et al.*, 2020).

Le modèle de composition de l'huile essentielle, la concentration de composants individuels et le rendement en HE dépendent de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les conditions internes de la plante comprennent la génétique (espèce, écotype et chémotype), la population végétale, l'origine de la plante, le type de partie de la plante, son stade de développement ou la période d'échantillonnage saisonnier, la voie physiologique et biochimique et la physiologie de la plante entière; l'état de développement des tissus synthétiques et des processus métaboliques est particulièrement significatif (Tonzibo *et al.*, 2013 ; Abbad *et al.*, 2013 ; Singh *et al.*, 2021). Les facteurs externes (climat et conditions de l'habitat, date de semis et variations des engrais), les conditions de culture (techniques agricoles) (température, humidité, rayonnement, vent, propriétés du sol, lieu géographique, temps et méthodes de récolte) et techniques post-récolte (méthodes de séchage et extraction, temps de distillation, méthodes de quantification et conditions d'analyse) (Yatagai *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 2008 ; Figueiredo *et al.*, 2008 ; Barra, 2009 ; Moghaddam *et al.*, 2015 ; Wu *et al.*, 2020 ; Moghaddam et Mehdizadeh, 2017 ).

Les changements climatiques au cours des saisons (température, humidité, rayonnement UV-B, CO<sub>2</sub> atmosphérique, etc.) ont un impact significatif sur la synthèse des terpènes (Mehalaine et Chenchouni 2021). Chez les conifères, les effets climatiques peuvent influencer directement l'activité de plusieurs enzymes, telles que l'isopentényl diphosphate isomérase et les prényltransférases, catalysant la synthèse de nombreux terpènes, ou indirectement par la régulation négative ou la dégradation du métabolisme primaire et, par conséquent, l'insuffisance de métabolites photosynthétiques impliqués dans la voie de biosynthèse des terpènes (Kopaczyk *et al.*, 2020). Ainsi, le changement des voies biochimiques des plantes et des processus physiologiques en fonction du temps de récolte pourrait réduire ou provoquer la synthèse de différents composés terpéniques ayant des conséquences importantes sur la protection des plantes contre les contraintes environnementales (Rahali *et al.*, 2017 ; Shams *et al.*, 2016).

La diminution du rendement en huiles essentielles avec l'augmentation de l'altitude dans les populations (Bouriache, Cheabet theniat khrouf, Ain Laaneb, Sidi Amor et Chikda) s'expliquerait par l'utilisation des métabolites secondaires telles que les huiles essentielles par les cellules végétales en réponse au stress hydrique et oxydatif (Mohamadi et Rajaei ; 2016 ; Coban *et al.*, 2018 ; Türkmen *et al.*, 2022). Le rendement dépend également du sol, de l'altitude, de l'exposition et de l'âge de la plante (Russo *et al.*, 2013 ; Vekiari *et al.* 2002 ; Karousou *et al.*, 2005 ; Kouamé, 2012 ; Elkady *et al.*, 2021).

### II. Composition chimique des huiles essentielles du *Pinus halepensis*

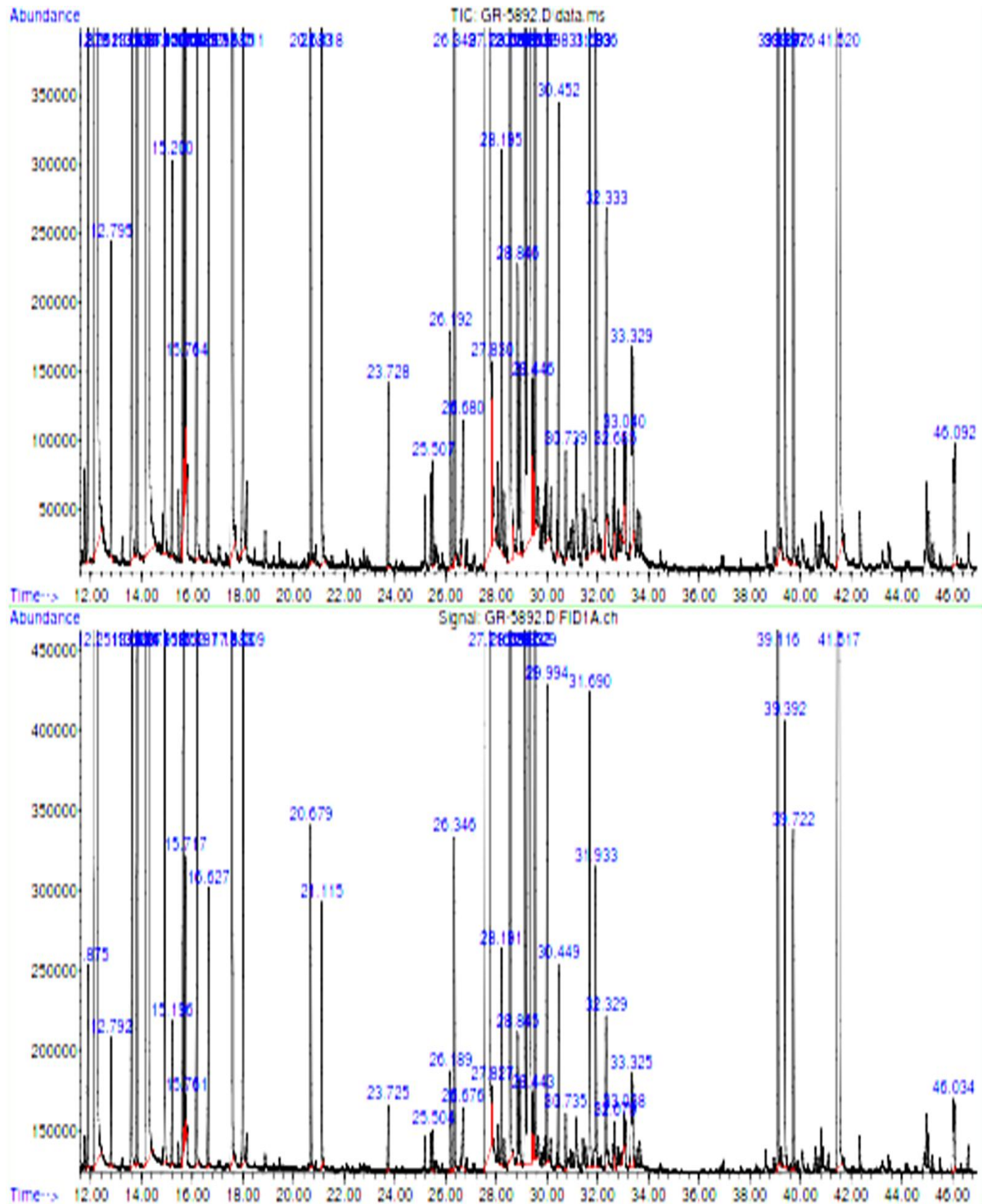
Les huiles essentielles du *P.halepensis* ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) (**Figure 9**). Les composées des huiles essentielles identifiées ainsi que leurs abondances relatives sont présentées en fonction de temps de rétention. L'analyse chimique a permis d'identifier 37 composés, dont le cumule correspond à une moyenne de  $99,40 \pm 0,5\%$  de l'huile totale (**Tableau 5**). Au minimum 17 composés sont identifiés dans l'HE extraite de la population Beni bezaz et au maximum 35 pour celle extraite de la population Sidi amor.

Les composés majoritaires de ces huiles sont le  $\beta$ -caryophyllène-E ( $29.06 \pm 8.5\%$ ), mycène ( $19.14\% \pm 6.67\%$ ),  $\alpha$ -pinène ( $16.86 \pm 3.35\%$ ), phényl éthyl 3-méthyl butanoate ( $5.67 \pm 2.47\%$ ),  $\alpha$ -humulène ( $4.81 \pm 1.43\%$ ), terpinolène ( $3.94 \pm 1.60\%$ ), sabinène ( $3.11 \pm 1.84\%$ ),  $\Delta^3$ -carene ( $2.18 \pm 1.85\%$ ), cembrene ( $2.15 \pm 1.93\%$ ) et le limonène ( $1.95 \pm 2.11\%$ ). D'autres composés sont



## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

également présents mais à des teneurs relativement faibles  $\beta$ -ocimène ( $1,28\% \pm 0,63$ ),  $\beta$ -pinene ( $1,18\% \pm 0,35$ ), Germacrene D ( $0,87\% \pm 0,50$ ),  $\alpha$ -Muurolene ( $0,78\% \pm 0,25$ ), Linalool ( $0,73\% \pm 0,65$ ).



**Figure 9.** Chromatogrammes (FID et Masse) de l'huile essentielle de *P. halepensis* (population d'Iraguene).

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 5.** Composition chimique des huiles essentielles des populations de *Pinus halepensis*.

Populations		Seriana	Djouada	Benibezaz	Iraguene	Daassa	Birghzala	Bouriache	CheabetThniat Khrouf	Ain laaneb	Sidiamor	Chikda	Boussenane	Troud	Tiziyaala	Tafrent	Moyenne	SD
Rendements (%)	KI	1,24	0,26	0,56	1,34	1,12	0,98	0,91	0,36	0,40	0,61	0,33	0,44	0,452	0,41	0,22	0,64	0,37
Nb de composés	Indice	22	24	17	24	23	24	32	35	28	35	27	29	22	23	26	28	7
Total (%)	Kovalt	99,9	99,2	99,3	99,7	99,4	99,7	98,8	98,5	98,2	98,8	98,7	99,5	99,8	99,2	98,5	99,4	0,5
$\alpha$ -thujene	924	0,38	0,42	0	0,12	0,19	0,22	0,38	0,30	0,37	0,31	0,23	0,46	0,33	0,28	0,35	0,29	0,12
$\alpha$ -pinene	935	14,4	16,30	9,67	16,50	17,37	20,60	13,95	15,14	17,33	15,39	17,86	16,05	23,97	21,08	17,39	16,86	3,35
Camphene	951	0,17	0,16	0	0,18	0,38	0,23	0,12	0,17	0,18	0,15	0,16	0,23	0,26	0,22	0,26	0,19	0,08
Sabinene	974	2,09	3,61	1,21	1,14	2,27	3,10	2,88	1,52	4,17	2,70	1,7	4,15	3,32	4,30	8,54	3,11	1,84
$\beta$ -pinene	979	1,06	1,18	0,60	0,92	0,94	1,40	0,91	0,89	1,13	1,16	0,95	1,37	1,85	1,51	1,82	1,18	0,35
Myrcene	991	28,1	20,60	13,40	21,30	7,74	20,11	14,58	16,80	13,9	29,25	23,69	14,50	28,23	24,01	10,90	19,14	6,67
$\Delta^3$ -carene	1009	1,00	1,43	0,60	2,01	0,57	2,60	1,23	0,90	4,28	1,17	1,14	4,30	2,66	1,51	7,33	2,18	1,85
$\alpha$ -terpinene	1017	0,17	0,33	0	0,09	0,66	0,45	0,27	0,19	0,19	0,25	0,14	0,23	0,40	0,43	0,45	0,28	0,17
Cymene-ortho	1020	0	0	0	0	0	0	0	0	0,31	0	0,09	0,25	0	0	0,67	0,09	0,19
Limonene	1030	0,38	0,54	0	0,22	6,61	0,90	4,28	1,44	4,78	0,37	0,84	3,23	0,55	4,35	0,71	1,95	2,11
$\beta$ -phellandrene	1032	0,45	0,69	0	0,34	0,38	0,68	0,47	0,35	0,71	0,46	0,53	0,65	0,62	0,65	0,74	0,51	0,20
1,8-cineole	1033	0	0	0	0,22	0	0	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0,06
$\beta$ -Ocimene (E)	1045	1,30	1,36	2,42	1,05	2,27	1,46	1,85	1,23	0,95	1,49	0,58	1,60	0,90	0,77	0	1,28	0,63
$\gamma$ -terpinene	1058	0,34	0,62	0	0,18	0,57	0,56	0,49	0,36	0,37	0,46	0,29	0,42	0,66	0,69	0,71	0,45	0,20
Terpinolene	1085	3,30	5,40	1,51	1,60	2,64	4,51	4,59	2,73	4,18	3,91	2,32	4,20	5,16	5,98	7,03	3,94	1,60
Linalool	1097	0	0	0	1,78	1,70	1,12	1,05	0,89	0,63	1,02	0,24	1,35	1,21	0	0	0,73	0,65
Terpinen-4-ol	1185	0	0,80	0	0	0	0	0,71	0,46	0,43	0,76	0,2	0,70	0	0	2,16	0,42	0,58
$\alpha$ -terpineol	1199	0	0,40	0	0,34	0	0,01	0,19	0,36	0	0,26	0	0	0	0	0	0,10	0,16
Geranylacetate	1377	0	0	0	0	0	0	0,86	0,20	0	0,23	0	0,40	0	0	1,30	0,20	0,39
$\alpha$ -funebrene-2-epi	1383	0,72	0,38	0	0,68	0,94	0,45	0,57	0,48	0,56	0,52	0,49	0,70	0,46	2,13	0	0,61	0,49

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 5. (Suite)**

Populations		Seriana	Djouada	Benibezaz	Iraguene	Daassa	Birghzala	Bouriache	Cheabet Thniat Khruf	Ain laaneb	Sidi Amor	Chikda	Boussenane	Troud	Tiziyaala	Taftent	Moyenne	SD
$\beta$ -caryophyllene (E)	1434	32,1	27,90	47,00	36,10	40,92	31,20	30,47	27,00	25,64	21,70	31,19	31,60	20,32	17,56	15,20	29,06	8,50
$\beta$ -farnesene (Z)	1453	0	0	0	0	0	0	0,24	0,30	0	0,22	0,1	0	0	0	0	0,06	0,11
$\alpha$ -humulene	1467	5,15	4,82	8,10	6,10	6,61	5,08	5,12	4,59	4	3,54	5,04	5,04	3,43	2,90	2,62	4,81	1,43
Germacrene D	1490	1,10	1,40	1,21	0,00	1,32	0	1,38	0	0,81	1,21	0,95	0,90	0,66	0,92	1,17	0,87	0,50
Phenylethyl 3-methyl butanoate	1496	4,50	4,53	7,85	6,46	4,10	4,00	4,58	10,03	8,74	4,47	7,24	2,65	2,97	3,20	9,71	5,67	2,47
$\alpha$ -muurolene	1506	0,79	0,49	0,60	0,60	0,94	0,30	1,04	0,87	0,84	1,05	0,88	1,32	0,77	0,60	0,56	0,78	0,26
$\Delta$ -amorphene	1525	0,58	0	0,60	0,50	0	0,07	0,48	0,66	0,66	0,59	0,45	0,11	0,44	0,50	1,49	0,48	0,37
Cadinal,4-diene trans	1543	0,48	0	0,91	0	0	0	0,52	0,29	0,38	0,15	0,22	0,40	0	0	0	0,22	0,27
Elemol	1555	1,30	0	0	0	0	0,02	0,17	0,08	0	0,08	0	0	0	0	0	0,11	0,33
Caryophyllene oxide	1595	0	0,63	1,81	0	0	0	0,54	0,72	0,73	0,49	0,39	0,93	0	0	0,63	0,46	0,50
Guaiol	1605	0	0	0	0	0,02	0,01	0,22	0,50	0	0,37	0	0	0	0,37	0	0,10	0,17
Humuleneepoxide II	1622	0	0	0	0	0	0	0	0,29	0	0,34	0	0	0	0	1,10	0,12	0,29
$\alpha$ -muurolol	1665	0	0	0	0,3	0	0	0	0,34	0	0,11	0	0	0	0	0	0,05	0,11
$\alpha$ -eudesmol	1667	0	0	0	0	0,04	0	0,16	1,25	0	0,14	0	0,63	0	0	0	0,15	0,35
Cubitene	1937	0	1,29	0,60	0	0,20	0	0,68	0,71	0,14	0,45	0	0,35	0	1,92	0,54	0,46	0,55
$\alpha$ -cembrene (3Z)	1967	0	0	0	0	0	0	0	0,52	0,13	0,30	0	0	0	0	0,06	0,06	0,15
Cembrene	2059	0	3,90	1,21	1	0	0,60	3,84	5,88	1,61	3,74	0,81	0,73	0,62	3,30	5,02	2,15	1,93

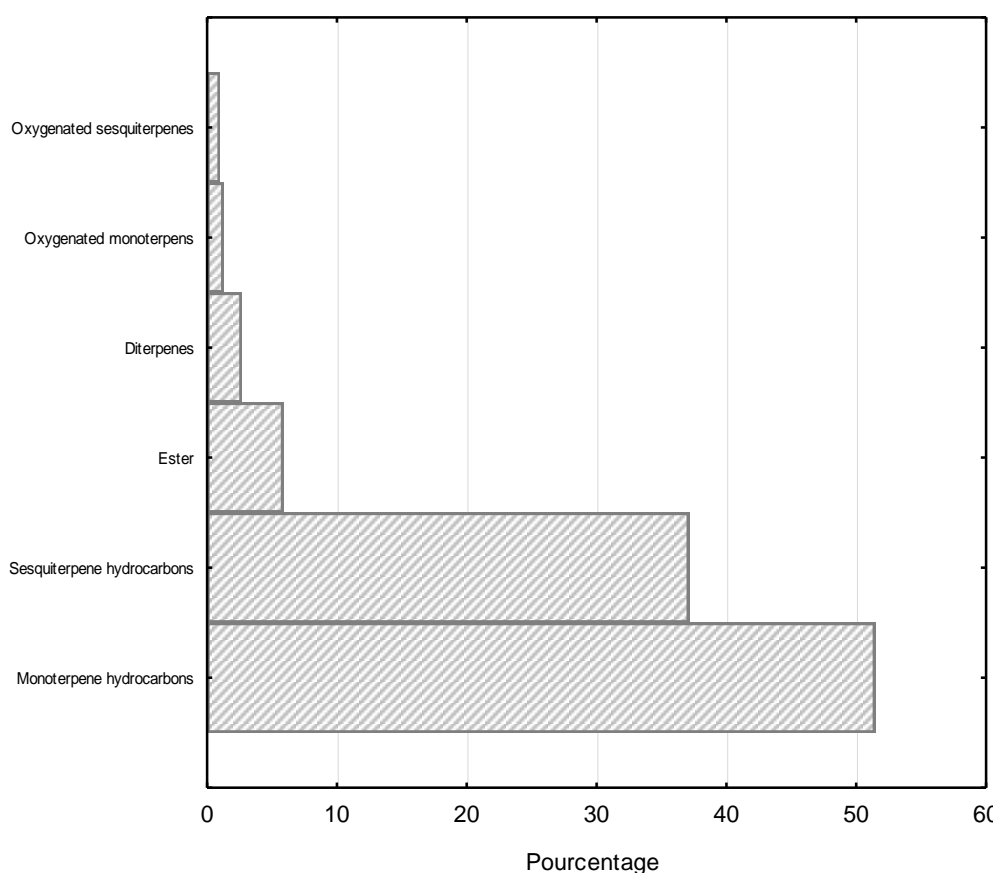
## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 6.** Les classes chimiques de l'huile essentielle de *Pinus halepensis*

Populations	Seriana	Djouada	Benibezaz	Iraguene	Daassa	Birghzala	Bouriache	CheabetThnia Khrouf	Ain laaneb	Sidiamor	Chikda	Boussenane	Troud	Tiziyaala	Tafrent	Moyenne	SD
Monoterpènes hydrocarbonés	53,12	52,64	29,41	45,65	42,59	56,82	46	42,02	52,85	57,07	50,52	51,64	68,91	65,78	56,9	51,45	19,36
Monoterpènes oxygénés	0	1,2	0	2,34	1,7	1,13	1,95	1,74	1,06	2,04	0,44	2,05	1,21	0	2,16	1,27	1,45
Sesquiterpènes hydrocarbonés	40,92	35,66	58,42	44,2	50,73	37,1	40,56	34,94	32,89	29,54	39,32	40,07	26,08	24,76	21,65	37,14	12,55
Sesquiterpènes oxygénés	1,3	0,63	1,81	0,3	0,09	0,03	1,09	3,31	0,73	1,63	0,39	1,56	0	0,37	1,73	1	1,8
Diterpènes	0	5,19	1,81	1	0,2	0,6	4,52	7,11	1,88	4,49	0,81	1,08	0,62	5,22	5,62	2,67	2,63
Ester	4,5	4,53	7,85	6,46	4,1	4	5,44	10,32	8,74	4,7	7,24	3,05	2,97	3,2	11,01	5,88	2,88

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Les analyses ont montré la prédominance des composés monoterpéniques hydrocarbonés ( $51,45 \pm 19,36\%$ ) avec une teneur variant de 29,41% chez la population de Beni bezaz à 68,91% chez la population de Troud. Cette fraction est dominée soit par le myrcène (7,74-29,25%) soit par l' $\alpha$ -pinene (9,67- 23,97%) (**Figure 10**). Les profils des monoterpènes hydrocarbonés mettent en évidence l'importance du terpinolene dans les échantillons des huiles essentielles de la plupart des populations (0,51–7,03 %) où il a été détecté comme composant majoritaire suivis par le sabinene (1,14–8,54 %), le  $\Delta^3$ -carene (0,54–7,33 %), le limonène (0 –6,61 %), le  $\beta$ -ocimene (E) (0- 2,42 %), le  $\beta$ -pinene (0,6-1,85 %) qui sont les autres monoterpènes hydrocarbonés les plus représentés (**Tableau 6**).



**Figure 10.** Classes chimiques de l'huile essentielle de *P. halepensis*.

Les sesquiterpènes hydrocarbonés représentent la deuxième classe de molécules la plus abondante (21,65-58,42 %), dont le  $\beta$ -caryophyllene-(E) est le plus abondant, suivi par l' $\alpha$ -humulène. Les esters sont présents avec une moyenne de  $5,88 \pm 2,88\%$  formés essentiellement par le phenylethyl 3-methyl butanoate et le geranylacetate. Alors que les diterpènes représentent une moyenne de  $2,67 \pm 2,63\%$ , principalement par le cembrene et le cubitene. Les

sesquiterpènes oxygénés et les monoterpènes oxygénés sont très minoritaires dans toutes les huiles essentielles analysées, puisque aucune fraction des deux n'a été identifiée à un taux important.

Il est à noter que quelques composés sont minoritaires tels que le Cymene-ortho qui est détecté dans les huiles essentielles des populations d'Ain laanab, de Boussenene et de Tafrent, et n'est pas détecté dans les huiles essentielles des autres populations. En addition, l'humulene epoxide II et l' $\alpha$ -muurolol sont détectés dans les huiles essentielles des populations de Cheabet Thniat Khrouf et de Sidi Amor.

### II.1 Analyse en composantes principales (ACP)

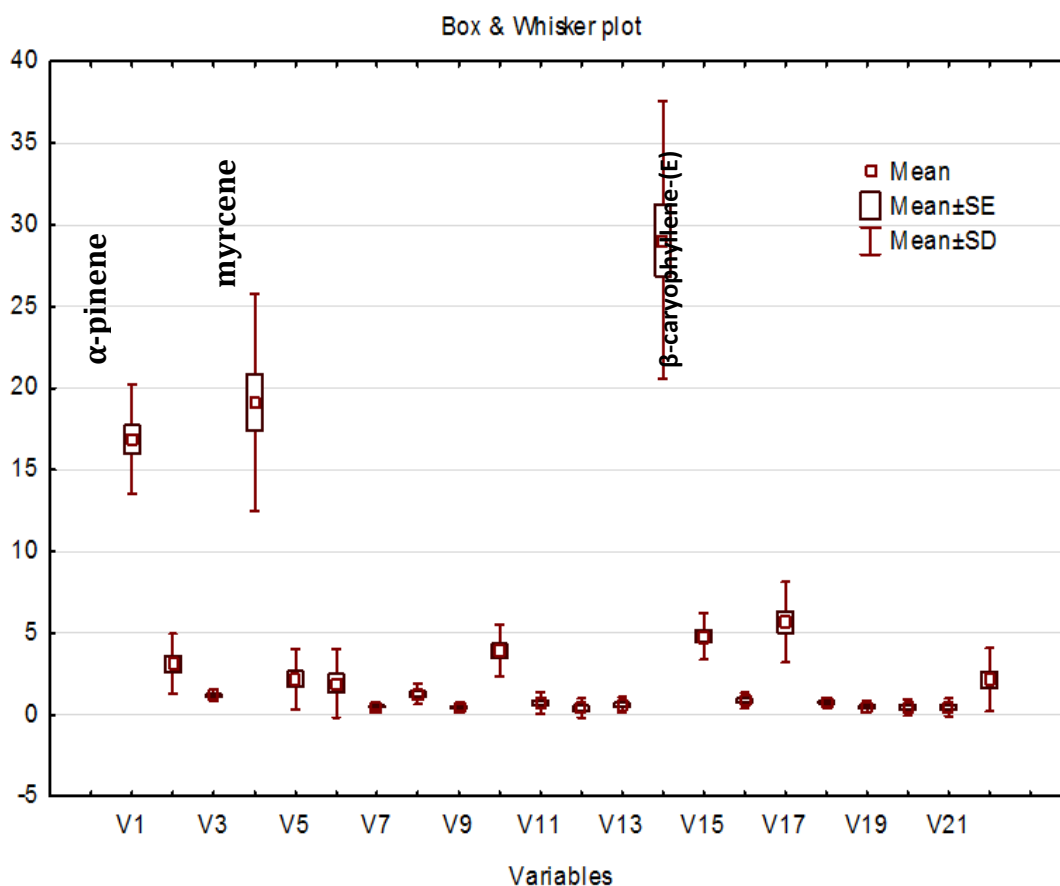
Les huiles essentielles des populations du *P. halepensis* présentent des variations qualitatives et quantitatives. Pour chercher les relations entre les populations étudiées, nous avons considéré chaque composé comme une variable quantitative à expliquer. Seuls les composants chimiques ayant une teneur supérieure à 0,3% sont pris en compte dans l'analyse en composantes principales (**Tableau 7**).

**Tableau 7.** Composés de l'huile essentielle utilisés dans l'analyse statistique.

Code	Composés	Code	Composés
V1	$\alpha$ -pinene	V11	Linalool
V2	Sabinene	V12	Terpinen-4-ol
V3	$\beta$ - pinene	V13	$\alpha$ -funebrene-2-epi
V4	Myrcene	V14	$\beta$ -caryophyllene (E)
V5	$\Delta^3$ -carene	V15	$\alpha$ -humulene
V6	Limonene	V16	Germacrene D
V7	$\beta$ -phellandrene	V17	Phenylethyl-3-methyl butanoate
V8	$\beta$ -ocimene (E)	V18	$\alpha$ -muurolene
V9	$\gamma$ -terpinene	V19	$\Delta$ -amorphene
V10	Terpinolene	V20	Caryophyllene oxide

### II.2 Variabilité des composants chimiques

L'analyse statistique (Box whisker) montre que les composants majoritaires des huiles essentielles des populations du *P. halepensis* présentent une importante variabilité interaspécifique (**Figure 11**). Le  $\beta$ -caryophyllene-(E) avec une moyenne de  $29,06 \pm 8,50\%$ , présente le plus de variation au sein des populations étudiées, suivi par le  $19,14 \pm 6,67\%$ , et de  $16,86 \pm 3,35\%$ .



**Figure 11.** Variation de la concentration des composés majoritaires chez *P.halepensis*.

Les valeurs propres représentant la variance des composants de l'huile sur les axes sont élevées, 36,80% pour le premier axe, 19,28% pour l'axe deux et 11,89% pour l'axe trois, donnant ainsi une bonne contribution à la variance totale. L'ensemble de l'information expliquée par les trois premiers axes issus de l'ACP est de 67,96%.

### II.3 Matrice des corrélations

L'examen de la matrice fait apparaître des coefficients de corrélation moyennes, 47,94% des variables sont significativement corrélées (**Tableau 8**).

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 8.** Matrice de corrélation des composants des huiles essentielles des populations de *Pinus halepensis*

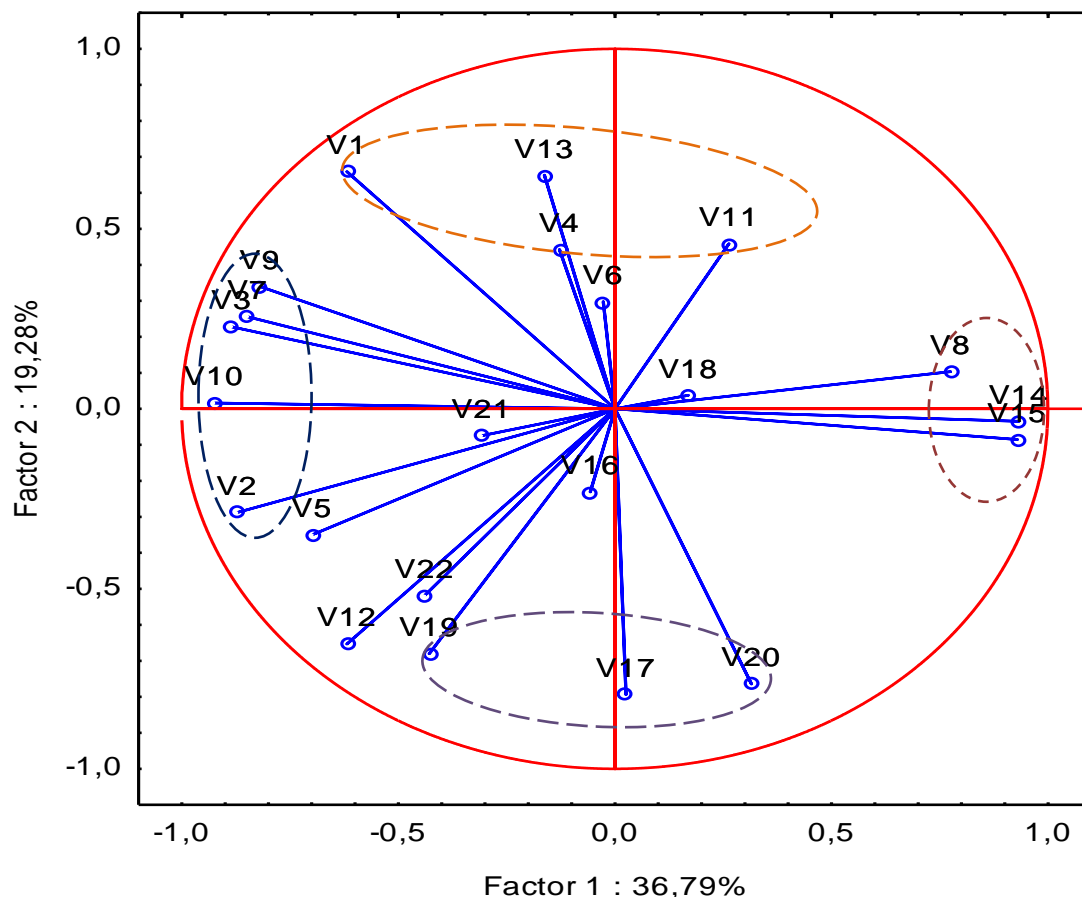
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	
<b>V1</b>	1,00																						
<b>V2</b>	0,32	1,00																					
<b>V3</b>	0,77	0,76	1,00																				
<b>V4</b>	0,33	-0,26	0,22	1,00																			
<b>V5</b>	0,27	0,87	0,67	-0,31	1,00																		
<b>V6</b>	0,13	0,12	-0,06	-0,53	-0,01	1,00																	
<b>V7</b>	0,68	0,71	0,77	0,12	0,62	0,18	1,00																
<b>V8</b>	-0,53	-0,58	-0,63	-0,28	-0,60	0,25	-0,63	1,00															
<b>V9</b>	0,70	0,68	0,79	0,05	0,37	0,29	0,77	-0,39	1,00														
<b>V10</b>	0,51	0,87	0,83	0,04	0,60	0,12	0,81	-0,51	0,87	1,00													
<b>V11</b>	0,21	-0,30	-0,06	-0,14	-0,07	0,29	-0,09	0,32	-0,02	-0,31	1,00												
<b>V12</b>	-0,13	0,79	0,38	-0,33	0,71	-0,10	0,41	-0,44	0,38	0,59	-0,26	1,00											
<b>V13</b>	0,40	-0,04	0,14	0,23	-0,26	0,54	0,20	-0,06	0,32	0,16	0,04	-0,41	1,00										
<b>V14</b>	-0,59	-0,69	-0,78	-0,35	-0,52	0,05	-0,74	0,77	-0,72	-0,81	0,24	-0,52	-0,22	1,00									
<b>V15</b>	-0,61	-0,68	-0,79	-0,35	-0,52	-0,01	-0,78	0,77	-0,73	-0,80	0,21	-0,49	-0,26	0,99	1,00								
<b>V16</b>	-0,33	0,26	-0,05	-0,16	-0,05	0,25	0,00	0,23	0,17	0,25	-0,41	0,32	-0,03	0,02	0,02	1,00							
<b>V17</b>	-0,38	0,10	-0,28	-0,38	0,26	-0,20	-0,23	-0,31	-0,38	-0,21	-0,29	0,38	-0,49	0,00	0,03	-0,19	1,00						
<b>V18</b>	-0,23	-0,12	-0,18	-0,09	-0,06	0,40	-0,08	0,24	-0,13	-0,19	0,36	0,08	0,08	0,05	0,00	0,30	-0,18	1,00					
<b>V19</b>	-0,14	0,51	0,24	-0,08	0,53	-0,27	0,01	-0,58	-0,01	0,26	-0,41	0,60	-0,28	-0,46	-0,42	0,04	0,67	-0,10	1,00				
<b>V20</b>	-0,71	0,00	-0,39	-0,43	0,08	-0,15	-0,41	0,33	-0,52	-0,20	-0,33	0,28	-0,51	0,33	0,37	0,28	0,45	0,17	0,21	1,00			
<b>V21</b>	-0,03	0,25	0,09	-0,03	-0,12	0,20	0,12	-0,04	0,35	0,44	-0,47	0,18	0,51	-0,33	-0,28	0,29	-0,10	-0,17	0,02	0,16	1,00		
<b>V22</b>	-0,16	0,37	0,10	-0,11	0,17	-0,08	0,14	-0,30	0,30	0,42	-0,29	0,65	-0,08	-0,54	-0,48	0,06	0,44	-0,05	0,48	0,25	0,60	1,00	

**Cor. > 0,377 significative, Cor > 0,534 Hautement significative**



### II.4 Cercle des corrélations

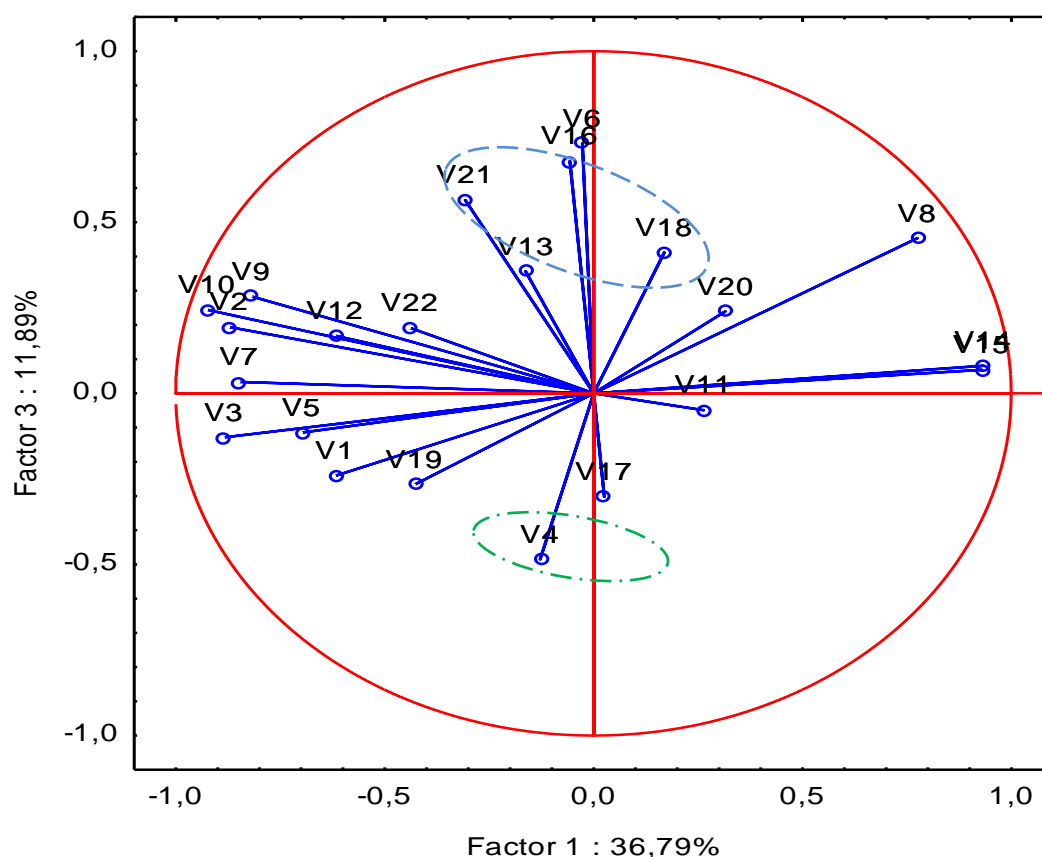
La représentation du plan formé par les deux premiers axes principaux plan 1x2 (**Figure 12**) montre que l'ensemble des composants de l'huile essentielle contribue fortement à la formation de l'axe 1.



**Figure 12.** Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x2).

La partie positive de l'axe 1 est expliquée par les variables : (V8)  $\beta$ -Ocimene (E),  $\beta$ -caryophyllene (E) (V14) et  $\alpha$ -humulene (V15), par contre la partie négative de l'axe est expliquée par les composés Sabinene (V2),  $\beta$ -pinene (V3),  $\Delta^3$ -carene (V5),  $\beta$ -phellandrene (V7),  $\gamma$ -terpinene (V9), Terpinolene (V10). L' $\alpha$ -pinene (V1), le Linalool (V11) et l' $\alpha$ -funebrene-2-epi (V13) expliquent la partie positive de l'axe 2, alors que sa partie négative est expliquée par le terpinen-4-ol (V12), phenylethyl 3-methyl butanoate (V17),  $\Delta$ -amorphone (V19), caryophyllene oxide (V20) et le cembrene (V22).

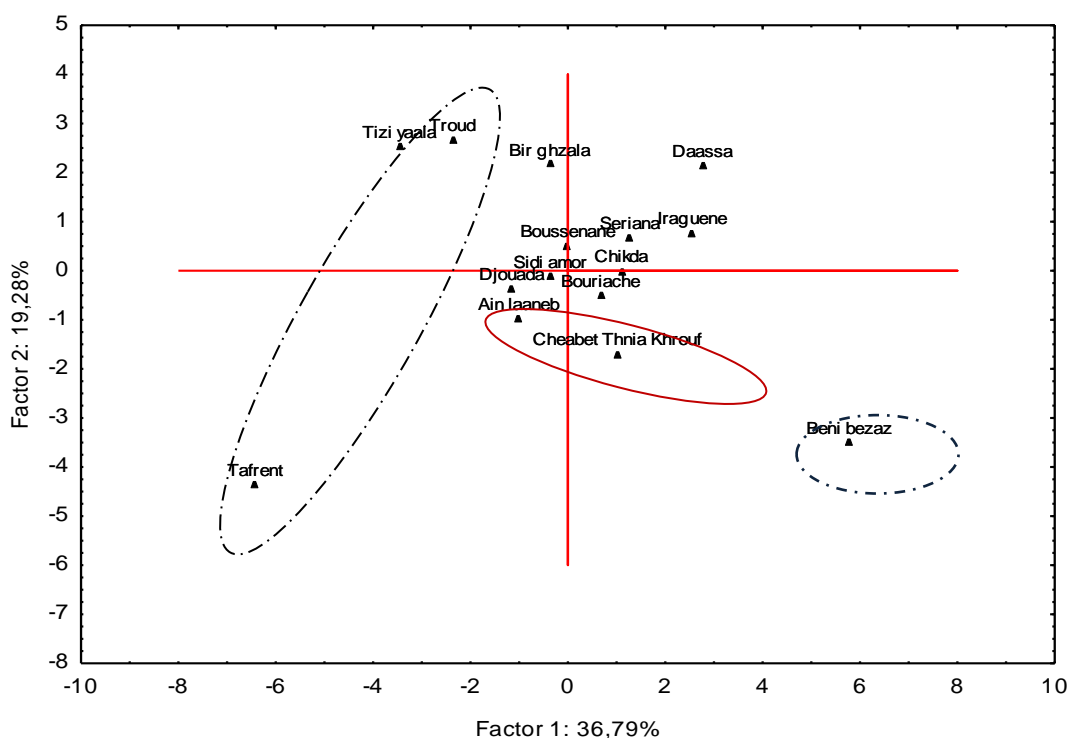
La représentation du plan formé par les deux premiers axes principaux plan 1x3 (**Figure 13**) montre que les variables (V6) Limonene, (V16) Germacrene D, (V18)  $\alpha$ -muurolene et (V21) cubitene expliquent la partie positive de l'axe 3, alors que sa partie négative est expliquée par le myrcene (V4).



**Figure 13.** Cercle des corrélations, projection des variables sur le plan (1x3)

### II.5 Etude des populations de *Pinus halepensis*

La représentation des individus (populations) sur le plan 1x2 (**Figure 14**) montre que la population de Beni bezez, localisée sur la partie positive de l'axe 1, est caractérisée par le  $\beta$ -ocimene-(E),  $\beta$ -caryophyllene-(E) et l' $\alpha$ -humulene. Dans la partie négative de l'axe 1, on retrouve les populations de Sidi Amor, Tizi Yaala et Tafrent qui sont caractérisées par le sabinene,  $\beta$ -pinene,  $\Delta^3$ -carene,  $\beta$ -phellandrene,  $\gamma$ -terpinene et le Terpinolene.



**Figure 14.** Projection des populations de *Pinus halepensis*, sur le plan (1×2).

Dans la partie négative de l'axe 2, se trouvent les populations de Chaabet Thniat khrouf et Ain Laaneb, ces populations se caractérisent par le terpinen-4-ol, le phenylethyl 3-methyl butanoate, le  $\Delta$ -amorphe, le caryophyllene oxide et le cembrene.

La représentation des populations du *P. halepensis* sur le plan 1x3, issu de l'ACP (**Figure 15**), montre que les populations de Djouada, Daassa, Bourriache et Bousenane sont situées dans la partie positive de l'axe 3, ces populations sont caractérisées par le limonene, le germacrene-D, l' $\alpha$ -muurolene et le cubitene. La partie négative de l'axe 3, regroupent les populations de Seriana, Iraguene, Bir ghzala, Chikida et Troud, qui sont caractérisées par le myrcene.

Pour caractériser les populations du *P. halepensis*, une projection spatiale tridimensionnelle des populations, basée sur les trois principaux axes (**Figure 16**), montre que les groupes des populations ne sont pas bien distinct. On remarque que les populations de Tafrent, Troud et Beni bezaz sont plus ou moins séparées du reste du groupe.

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

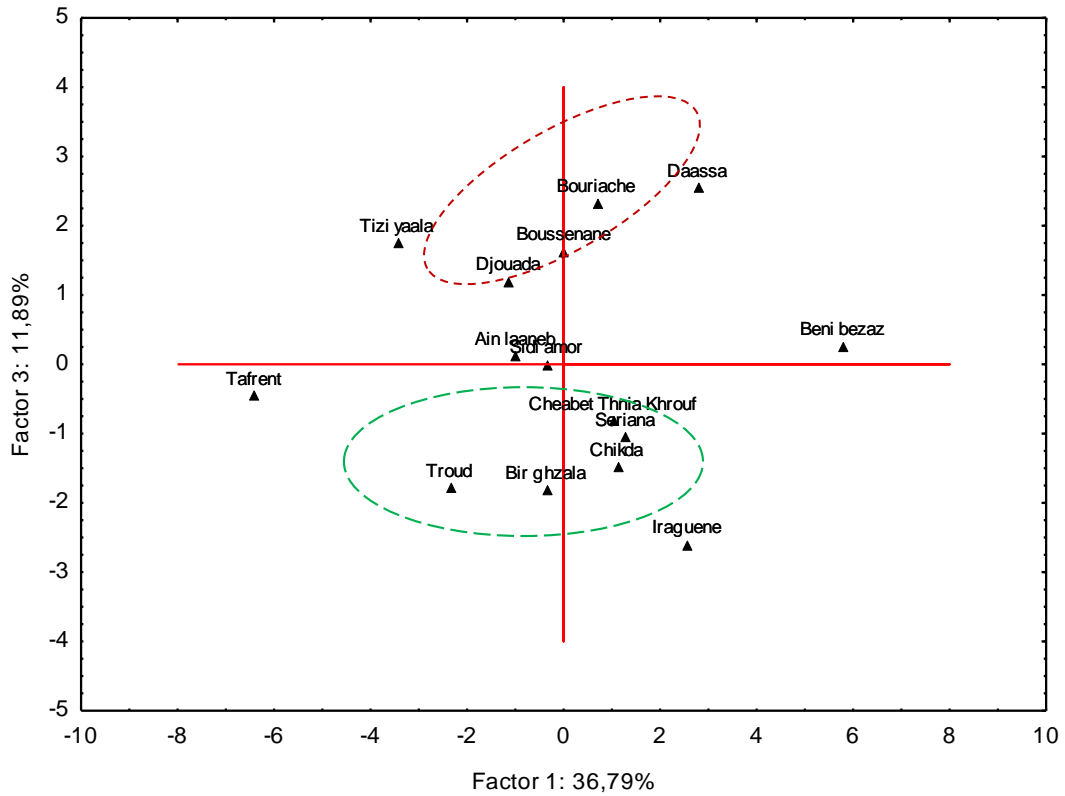


Figure 15. Projection des populations de *Pinus halepensis* sur le plan (1x3).

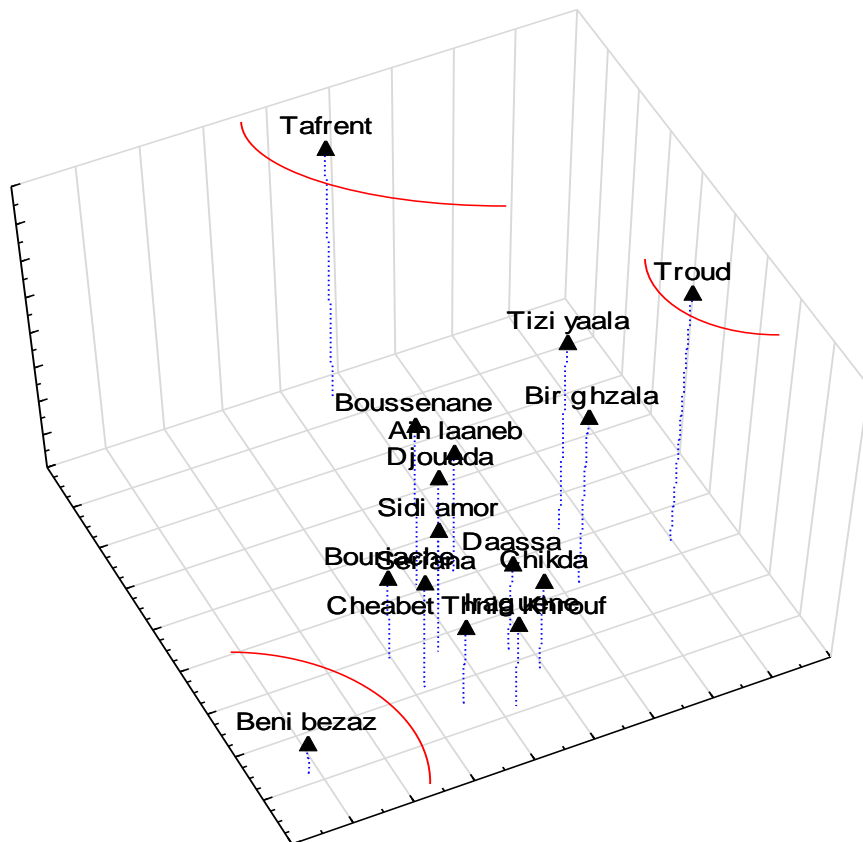
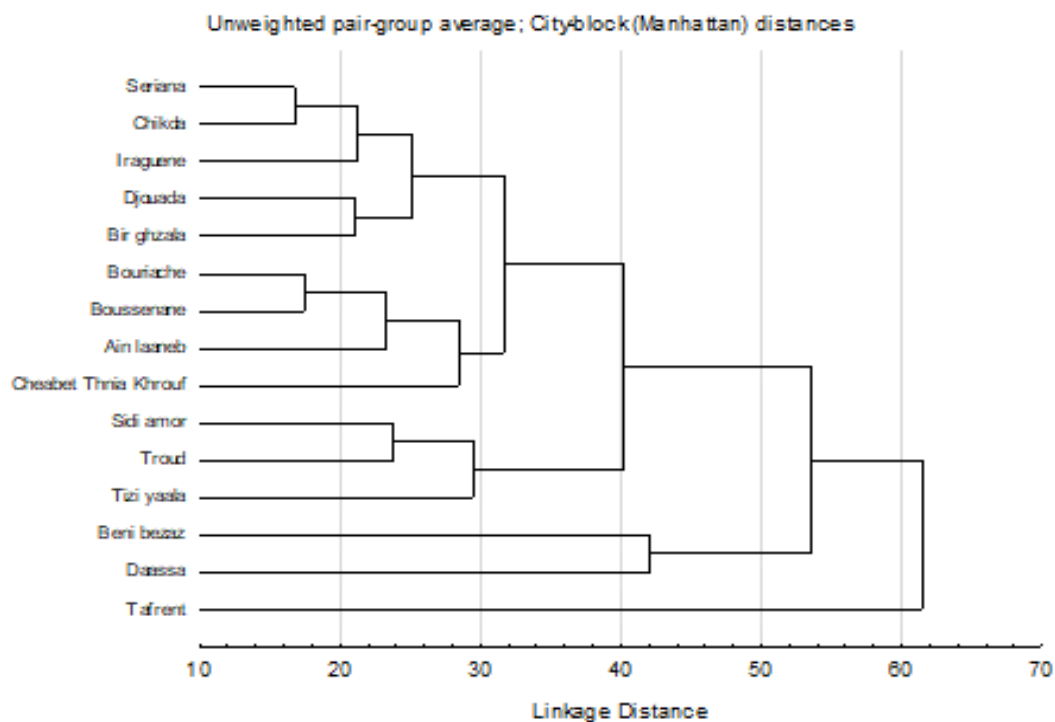


Figure 16. Projection spatiale des populations de *Pinus halepensis*.

### Analyse UPGMA

Les huiles essentielles des populations algériennes de *Pinus halepensis* présentent une importante variation qualitative et quantitative. Afin d'estimer la relation existante entre les populations basées sur la composition chimique de ces huiles essentielles, une classification hiérarchique UPGMA est réalisée (**Figure 17**).



**Figure 17.** Classification hiérarchique des populations du *Pinus halepensis*.

L'UPGMA confirme les résultats issus de l'ACP et sépare les populations du *P. halepensis* en deux principaux clusters. Le cluster I, représenté par la population de Tafrent qui est caractérisée par une valeur élevée en sabinene,  $\Delta^3$ -carene et terpinolène, cette combinaison représente le chémotype à sabinene- $\Delta^3$ -carene-terpinolène. Le cluster II regroupe le reste des populations qui s'isolent par la présence de taux élevé de caryophyllène-(E) est forme le cluster II. L'analyse de ce cluster révèle l'existence d'une grande diversité chimique et peut être subdivisé en deux groupes. Le premier groupe est formé des huiles essentielles des populations de Daassa et Beni Bezez, caractérisées par des teneurs élevées en  $\alpha$ -humulène.

Le reste des populations forme le deuxième groupe du cluster II, qui est subdivisé en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe, caractérisé par la présence de taux élevés d' $\alpha$ -pinène, est formé par les populations de Cheabet Thniyat Khrouf, Bourriache ; Boussenene ; Ain Laanab ; Djouada ; Bir ghzala ; Iraguene ; Chikda et Seriana. Alors que le sous-groupe 2 est composé par les populations de Sidi Amor ; Troud et Tizi Yaala, caractérisées par un taux élevé de

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

myrcene. Sur la base de l'analyse UPGMA, au moins quatre chémotypes ont été identifiés dans l'huile essentielle de *P. halepensis* (Tableau 9).

**Tableau 9.** Chémotypes identifiés dans l'huile essentielle de *Pinus halepensis*.

Chémotypes	Populations
1- Sabinene - $\Delta^3$ -carene – terpinolene	Tafrent
2- $\beta$ -caryophyllene-E - $\alpha$ -humulene	Beni Bezez et Daassa
3- $\beta$ -caryophyllene-E - $\alpha$ -pinene - $\alpha$ -humulene	Cheabet Thniyat Khrouf ; Bouriache; Boussenene; Ain Laanab; Djouada; Birghzala; Iraguene; Chikda et Seriana
4- $\beta$ -caryophyllene-E - $\alpha$ -pinene - myrcene	Sidi Amor; Troud et Tizi Yaala

L'analyse phytochimique des huiles essentielles du *P. halepensis* a montré une diversité de métabolites secondaires appartenant à différentes classes (Dob *et al.*, 2005; Asensio *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2008 ; Mohamed *et al.*, 2020 ; Nam *et al.*, 2016 Ashmawy *et al.*, 2018 ; Mohareb *et al.*, 2017 ; Meziti *et al.*, 2019 ; Gad *et al.*, 2021).

Les terpénoïdes sont le groupe le plus abondant et le plus actif des métabolites secondaires dans les huiles essentielles de *P. halepensis* (Tableau 2-3). Plusieurs études montrent la grande diversité de compositions chimiques des huiles essentielles de *pinus halepensis* dont les hydrocarbures monoterpéniques et les sesquiterpènes ont été signalés comme les principaux constituants (Mitić *et al.*, 2018).

L'huile essentielle de *pinus halepensis* a fait l'objet de plusieurs études dans le monde et en Algérie. La comparaison des résultats sur les huiles essentielles de différentes provenances avec ceux de la littérature révèle que notre composition chimique est proche de celles reportées pour les huiles essentielles de *P. halepensis* du Maroc (Hmamouchi *et al.*, 2001) et de l'Italie (Vidrich *et al.*, 1988). Les résultats montrent la dominance de l' $\alpha$ -pinene (8.5-23.3%), le sabinene (3.7-9.4%), le myrcene (12.5-27.9%) et le  $\beta$ -Caryophyllene (14,2-26,3%). Sur la provenance de la Grèce, ces composés sont détectés avec des pourcentages de 13.4%, 1.3%, 6.6% et 19,1% respectivement (Roussis *et al.*, 1995), alors que dans nos provenances, nos résultats montrent la présence de  $\beta$ -Caryophyllene à 29,06% comme composé majoritaire, le taux le plus faible a été enregistré dans les populations de Tafrent avec 15,20% alors que le taux le plus élevé a été enregistré à Beni Bezez avec 47%. Ces résultats sont trouvés par plusieurs autres travaux, Corse (Nam *et al.*, 2015), Lybie (Mohareb *et al.*, 2017), Maroc (Macchioni *et*

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

*al.*, 2003), alors que ce composé est absent dans les populations de Tunisie (Amri *et al.*, 2013, 2014 ; Dziri et Hosni, 2012).

Les principaux composés des huiles de nos populations de *P. halepensis* étaient semblables à ceux étudiés du Maroc (Bouyahya *et al.*, 2019) et de l’Egypte (El-Settawy *et al.*, 2016), car on a enregistré les composés majoritaires  $\beta$ -caryophyllène (28,04%-40,8%), myrcène (0-23,81%),  $\alpha$ -pinène (10,3-12,02%) avec des valeurs très proches.

Les résultats montrent la présence d’oxide de caryophyllene comme composé minoritaire dans certains de nos provenances (0,93 à Beni bezez, 1,81% à Boussenene), il a été détecté comme composé majoritaire avec un taux de 48,2%, dans les huiles essentielles de la provenances de Ghazaouet (Abi-Ayad *et al.*, 2011) , mais, il n’est pas détecté dans le cas des provenances de la Grèce, de l’Italie et du Maroc (Roussis *et al.*, 1995 ; Hmamouchi *et al.*, 2001). En outre, le thumbergol est détecté dans les huiles essentielles des populations de Ghazaouet avec un pourcentage de 8,3 % (Abi-Ayad *et al.*, 2011) , en Grèce avec un pourcentage de 29,2% (Mirtic *et al.*, 2019), en Lybie avec un pourcentage de 6,23% (Mohareb *et al.*, 2017) et en Egypte avec un pourcentage de 4% (El-Settawy *et al.*, 2016). Cependant, ils n’est pas détectés dans nos résultats et ceux des travaux antérieurs (Dob *et al.*, 2007; Tumen *et al.*, 2010 ; Abi-Ayad *et al.*, 2011 ; Bouyahya *et al.*, 2019).

La composition chimique des échantillons (myrcène majoritaire), Sidi amor (29,25%), Troud (28,28%) et Tizi yaala (24,01%) ressemble à celle d’un échantillon d’Italie (27,9 %) (Macchioni *et al.*, 2003), de dix échantillons d’Algérie provenant de la région de Tlemcen (jusqu’à 32 %) (Fekih *et al.*, 2014), et des échantillons de Corse (38,5%) (Nam *et al.*, 2014). Les auteurs suggèrent que cette différence est certainement liée à la variabilité des conditions climatiques entre les altitudes. Une étude réalisée en Algérie a indiqué que les composants de l’huile essentielle *P. halepensis* présentaient des variabilités selon l’altitude,  $\alpha$ - pinène (12,9 % - 22,3 %), myrcène (21,6 %-24,1 %), p-cymène (11,9 %-14,6 %),  $\beta$ -caryophyllène (21,2 %-27,4 %) et oxyde de caryophyllène (0 %-12,5 %) (Djerrad *et al.*, 2015) ce qui concorde avec nos résultats et les résultats de Fekih *et al.*, (2014) à Telemcen et Mohareb *et al.*, (2017) en Lybie . Ces résultats sont confirmés par plusieurs auteurs sur d’autres espèces de conifères (Abbad *et al.*, 2013 ; Hajdari *et al.*, 2015 ; Amri *et al.*, 2017 ; Dakhlaoui *et al.*, 2021 ; Romanenko *et al.*, 2022).

Une variabilité de la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes en fonction du lieu de récolte et de l’altitude est observée. Plusieurs études ont prouvé que la composition chimique de l’huile essentielle de *Pinus halepensis* varie généralement en fonction de la situation géographique, l’altitude, les conditions climatiques et moment de la collecte ; et

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

cela peut également affecter son potentiel biologique (Fekih *et al.*, 2014 ; Djerrad *et al.*, 2015 ; Hamrouni *et al.*, 2016 ; Khouja *et al.*, 2021).

D'une manière générale nos échantillons d'huiles essentielles ont une composition chimique plus riche en monoterpènes hydrocarbonés que les sesquiterpènes hydrocarbonés. Ces différences, comme nous l'avons précisé, sont très probablement liées aux facteurs environnementaux des localités tels l'ensoleillement ou plus particulièrement la composition du sol, comme le suggère certains travaux reliant la teneur en sesquiterpènes hydrocarbonés des huiles essentielles, à la minéralisation du sol sur lequel poussent les végétaux (Aissi *et al.*, 2016). Cette variabilité chimique mène à conclure que la variation géographique pourrait influencer qualitativement et semiquantitativement la composition chimique des huiles essentielles des provenances.



### III. Activité antibactérienne des huiles essentielles de *P. halepensis*

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *P. halepensis* a été évaluée par la méthode de diffusion en disque, les résultats sont exprimés par la mesure de la moyenne du diamètre des halos d'inhibition (Tableau 10).

Les huiles essentielles des populations étudiées présentent une bonne activité inhibitrice contre des microorganismes testés à l'exception d'*E. coli* et *P. aeruginosa* qui montrent des résistances à l'encontre de toutes les huiles diluées et concentrées des populations étudiées.

Toutes les huiles essentielles inhibent la croissance de *S. aureus*, *K. pneumonia*, *S. enteric*, *L. innocua*, *B. cereus*, et *P. mirabilis*, dont les bactéries *S. aureus* et *K. pneumonia* sont les plus sensibles aux huiles essentielles de *P. halepensis* avec un diamètre de la zone d'inhibition est de 10 à 32 mm.

La majorité des huiles testées ont exercé un pouvoir antibactérien très important et même plus supérieur que celui des antibiotiques sur *K. pneumonia* particulièrement les huiles pures des populations de Tafrent avec un diamètre d'inhibition de (31,7±2), Tizi yalaa (30,3±0,6), Troud (28,7±0,6) et Sidi Amor (30,7±1,2). Par contre une faible activité des huiles de ces populations, a été observée contre *K. pneumonia* à la dilution 1/4, cette bactérie a montré une résistance contre les huiles des populations Daassa, Beni bezez, Seriana, Bir Ghzala et Iraguene.

La souche *S. aureus* est très sensible à l'huile pure des populations de Tizi Yaala, Troud, Sidi Amor, Boussenene et Chikda avec des diamètres d'inhibitions moyens. Par ailleurs les huiles de *P. halepensis* s'avèrent moins actives contre *P. mirabilis* ou les diamètres des zones d'inhibition varient entre 7,2 et 20 mm. Une modeste activité est remarquée contre *B. cereus* ou le diamètre le plus élevé est enregistré pour l'huile de Chikda avec une moyenne de 17,67±1,7 mm. L'effet inhibiteur exercé contre *L. innocua* et *S. enteric* a été nettement moins important. Les diamètres des halos formés varient entre 7 et 13,7 mm.

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 10.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles des populations de *P.halepensis*.

Populations	Dilution	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> +	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. enteric</i>	<i>L. innocua</i> +	<i>B. cereus</i> +	<i>P. mirabilis</i>
Daassa	1	0	0	0	0	0	7±0	0	0
	1/2	0	0	0	0	0	9,7±0,6	0	0
	1/4	0	0	0	0	0	8±0	8±0	0
	1/8	0	0	0	0	0	7±0	8±0	0
Beni bezaz	1	0	0	0	0	0	8±0	6,8±0,8	0
	1/2	0	0	0	0	0	8±0	7,5±0,5	0
	1/4	0	0	0	0	0	0	8,3±0,6	0
	1/8	0	0	0	0	0	0	9±0	0
Tafrent	1	0	0	0	31,7±2	13,7±1,2	0	0	19,3±6,1
	1/2	0	0	15±2	17,33±0,6	14±0	0	0	20±0
	1/4	0	0	12,3±0,6	14±1	0	0	0	18±1
	1/8	0	0	13,3±2,9	10±0	0	0	0	9,7±0,6
Tizi yaala	1	0	0	25±1	30,3±0,6	0	8,5±0,5	0	10,2±0,3
	1/2	0	0	20,2±1,3	17,8±0,8	0	10,5±0,5	0	7,7±0,5
	1/4	0	0	12,8±0,8	7±0	0	7,7±1,2	8,3±0,6	0
	1/8	0	0	10,3±1,5	0	0	0	8±0	0
Troud	1	0	0	25,3±4,2	28,7±0,6	0	8,7±0,6	10±0	0
	1/2	0	0	12±1	14,3±1,2	0	7±1	9±0	9,7±0,6
	1/4	0	0	11,3±1,5	9,3±0,6	0	7,3±1,2	0	0
	1/8	0	0	10,3±0,6	6,3±0,6	0	0	0	0
Sidi amor	1	0	0	30±0	30,7±1,2	0	7,3±0,6	10,3±0,6	8±0
	1/2	0	0	20,3±2,5	14±0	0	9,7±0,6	7,8±0,8	7,2±1
	1/4	0	0	13±1,73	8,3±0,6	0	8±0	0	0
	1/8	0	0	11±1,73	7,3±0,6	0	7±0	0	0
Seriana	1	0	0	20,0±0,5	0	0	0	8±0	0
	1/2	0	0	10,3±0,6	0	0	0	8±0	0
	1/4	0	0	8,3±0,6	0	0	0	8±0	0
	1/8	0	0	0	0	0	0	8±0	0
Ain laaneb	1	0	0	18±2	0	7±0	9±0	11,3±0,6	8,3±0,6
	1/2	0	0	13±1,7	13,3±1,5	7,3±0,6	9,7±0,6	10,5±0,5	8±0
	1/4	0	0	10,3±0,6	9±1	7,3±1,2	9,7±0,6	12,8±0,3	0
	1/8	0	0	8±0	9,7±0,6	7,7±0,6	10±0	11,7±1,2	0
Boussenane	1	0	0	20,7±1,2	9,7±0,6	7,6±0,6	11±1,7	12,3±1,5	8±1
	1/2	0	0	16±2	8,3±0,6	8±0	10,7±0,6	12,3±0,6	7,3±0,6
	1/4	0	0	12,7±2,5	7,7±0,6	7,6±0,6	9±1	15,7±1,2	0
	1/8	0	0	11,7±0,6	7±0	7±0	9,3±1,2	12,3±2,3	0
Bouriache	1	0	0	17±3,6	11,8±0,3	6,6±1,2	10±1,7	13,3±1,3	7,7±0,6
	1/2	0	0	10±1	10,3±0,6	8±0	8±0	8±0	8,3±0,6
	1/4	0	0	9,7±0,6	8,2±0,3	8±0	8,7±2,1	12,3±1	0
	1/8	0	0	7,7±0,6	0	0	8,7±0,6	13±0,8	0
CheabetThni atKhrouf	1	0	0	8,7±0,6	0	0	8±0	0	8,3±0,6
	1/2	0	0	15±0	13±1,7	0	8±0	0	8±0
	1/4	0	0	0	12,7±2,1	0	0	0	0
	1/8	0	0	8±0	11,7±2,3	0	0	0	0
Bir ghzala	1	0	0	14,3±1,2	0	0	12±1	9,5±0,5	0
	1/2	0	0	12±1,7	0	0	12±1,7	8,17±0,3	0
	1/4	0	0	14,7±2,5	0	0	0	7,33±0,6	0
	1/8	0	0	10,3±2,3	0	0	0	7±0	7,7±0,6

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

**Tableau 10. Suite**

Populations	Dilution	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> +	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. enteric</i>	<i>L. innocua</i> +	<i>B. cerus</i> +	<i>P. mirabilis</i>
Djouada	1	0	0	11,7±0,6	0	0	10,3±1,5	10,3±0,6	0
	1/2	0	0	10,3±0,6	7,67±1,2	0	8±0	9,3±0,6	0
	1/4	0	0	8,8±0,3	7±0	0	8,7±2,1	8±0	0
	1/8	0	0	0	7±0	0	8,3±1,5	8±0	8±0
Iraguene	1	0	0	0	0	0	9±0	14,33±0,6	0
	1/2	0	0	0	0	0	8,7±0,6	10±0	0
	1/4	0	0	0	0	0	8,7±0,6	8,17±0,3	0
	1/8	0	0	0	0	0	10±0	8,67±0,6	0
Chikda	1	0	0	20±0	0	0	12±1	17,67±1,7	0
	1/2	0	0	8,7±1,2	7±0	0	12±1,7	0	0
	1/4	0	0	11,3±1,5	8±1	0	0	11,67±0,9	0
	1/8	0	0	8±0	8±0	0	0	9±1,4	0
Antibiotique	Gentamicin	23±0	19,3±0,6	25,7±0,6	20,3±0,6	7,3±0,6	18,3±0,6	0	18,3±0,6
	Eurythromycine	10,7±0,6	14,7±0,6	35±1	21,7±0,6	11,3±0,6	30,7±0,6	19,7±0,6	27,3±0,6
	Amoxillin	22±1	12±1	0	14,3±0,6	0	29,7±0,6	22,7±0,6	30,3±0,6
	Meropenem	35±1	27,7±0,6	30,3±0,6	29,7±0,6	26±0	32,3±0,6	14,3±0,6	32,7±0,6
	Oxacillin	0	0	0	17,7±0,6	0	19,3±0,6	0	10,3±0,6

### Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse statistique ANOVA à trois voies montre que les populations, les doses et les souches bactériennes, ainsi que leurs interactions, sont très fortement significatifs ( $P < 0,001$ ) (Tableau 11).

**Tableau 11.** Principaux facteurs et interactions des huiles essentielles de *P. halepensis*.

Source	df	F	P
<b>Facteurs</b>			
<b>Populations</b>	14	143,70	,0000 ***
<b>Dilutions</b>	8	47297,68	,0000 ***
<b>Bactéries</b>	7	12069,2	,0000 ***
<b>Interactions</b>			
<b>Populations * Dilutions</b>	112	43,37	,0000 ***
<b>Populations* Bactéries</b>	98	67,57	,0000 ***
<b>Dilutions * Bactéries</b>	56	3372,36	,0000 ***
<b>Populations * Dilutions * Bactéries</b>	784	25,83	,0000 ***

Note \*\*\* Très hautement significatif ( $P < 0,001$ )

L'huile essentielle non diluée a montré l'effet le plus puissant par rapport aux huiles diluées, et les huiles les plus efficaces contre les bactéries testées étaient celles de *P. halepensis* des

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

populations de Boussenen et Ain Laaneb (groupe a). Par contre, l'huile des populations de Daassa et Beni Bezaz a montré la plus faible activité antibactérienne (groupe i) (**Tableau 12**).

**Tableau 12.** Effet des d'huile sur les bactéries testées.

Rang	Populations	Moyenne zones d'inhibition	n	Groupes signifiants													
1	Boussenen	13,25	216	a													
2	Ain Laaneb	13,13	216	a													
3	Tafrent	12,92	216		b												
4	Sidi Amor	12,81	216		b												
5	Bouriache	12,71	216			bc											
6	Tizi Yaala	12,59	216				c										
7	Troud	12,30	216					d									
8	Djouada	11,88	216						e								
9	Chikda	11,88	216						e								
10	Bir Ghzal	11,65	216							f							
11	Cheabet T, K	11,47	216								g						
12	Iraguene	11,13	216									h					
13	Seriana	11,04	216									h					
14	Daassa	10,73	216														i
15	Beni Bezaz	10,69	216														i

LSD = 0,174

Les antibiotiques utilisés ont un effet antibactérien plus prononcé sur les souches testées que les huiles essentielles de *Pinus halepensis* avec des diamètres d'inhibition entre 9,46 et 27,5 mm (**Tableau 13**). Le meilleur pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* est observé à l'huile concentré. Alors que les effets des dilutions (1/4 et 1/8) sont non significatifs.

**Tableau 13.** Effet des dilutions d'huile et des antibiotiques sur les bactéries testées.

Rang	Dilutions	Moyennes zones d'inhibition n	n	Groupes signifiants										S*			
1	Meropeneme	27,5	360	a													+++
2	Erythromycine	21,13	360		b												+++
3	Amoxicilline	16,36	360			c											++
4	Gentamicine	16,04	360				d										++
5	Oxacilline	9,46	360					e									+
6	1	5,86	360						f								-
7	1/2	5,05	360							g							-
8	1/4	3,65	360								h						-
9	1/8	3,04	360									i					-

LSD = 0,135

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

La bactérie la plus sensible est *L. innocua* avec une zone d'inhibition moyenne de 17,26 mm, alors que la bactérie *S. enterica* est la plus résistante à l'huile avec une zone d'inhibition de 5,06 mm (**Tableau 14**).

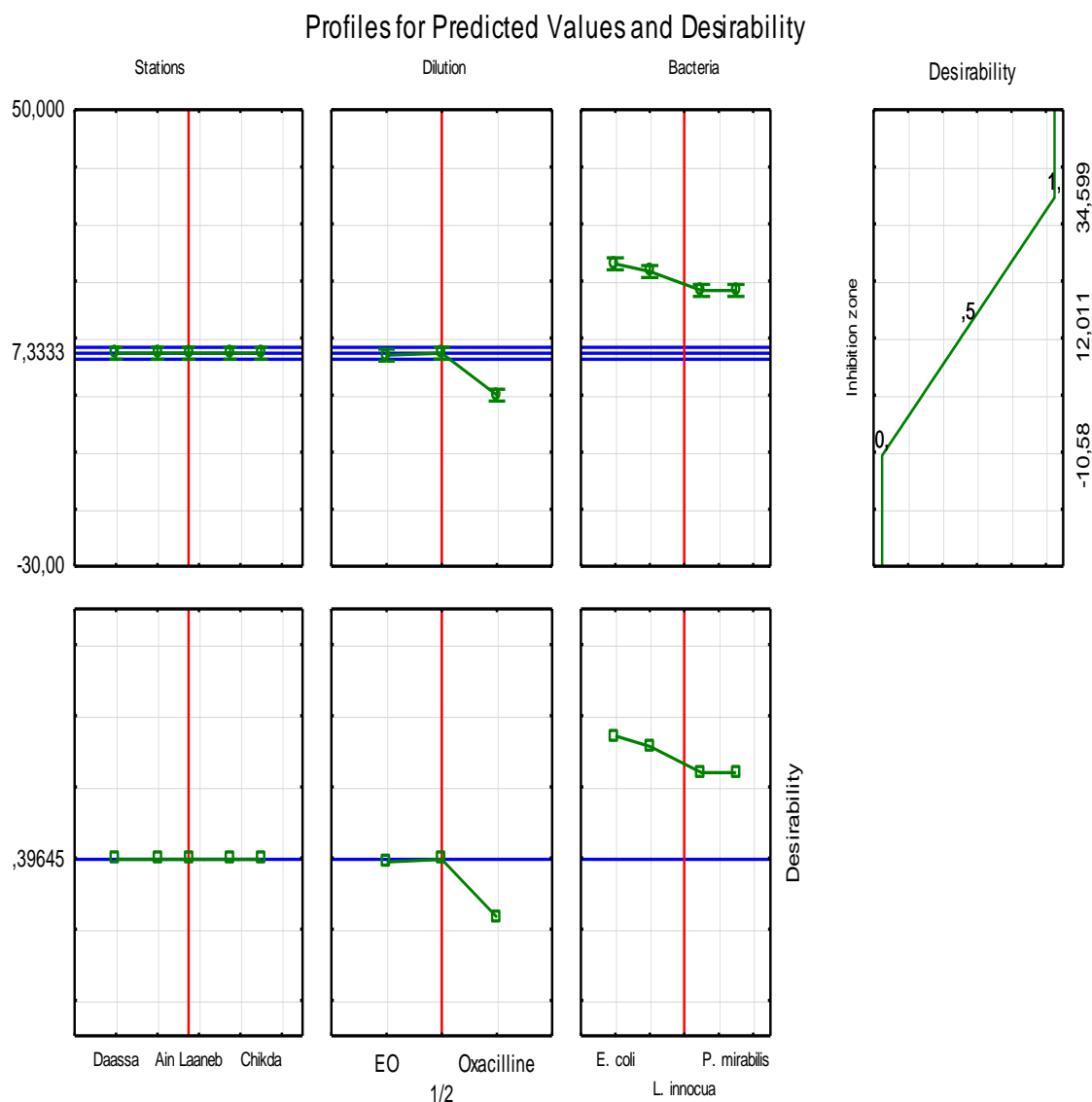
**Tableau 14.** Efficacité des huiles essentielles contre les bactéries testées.

Rang	Souches bactériennes	Moyennes zone d'inhibition	n	Groupes significants								S*
1	<i>Listeria innocua</i>	17,26	40	a								++
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	16,98	40		b							++
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14,738	40			c						+
4	<i>Proteus mirabilis</i>	14,60	40				d					+
5	<i>Escherichia coli</i>	9,85	40					e				+
6	<i>Bacillus cereus</i>	9,42	40						f			+
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,19	40							g		-
8	<i>Salmonella enterica</i>	5,06	40								h	-

LSD = 0,127

### III.2 Test de désirabilité

Le profil de désirabilité des huiles essentielles de *P. halepensis* par rapport aux bactéries testées avait une valeur de prédiction de 0,38287 (**Figure 18**). L'antibiotique oxacilline présente une valeur inférieure à celle de la prédiction. Le test de désirabilité a montré que les espèces bactériennes testées ont des valeurs inférieures à celle de la prédiction. Les concentrations d'huile utilisées dans cette étude montrent une faible activité contre les bactéries testées, avec une valeur prédictive de 0,3984.



**Figure 18.** Profil des valeurs prédites et de la désirabilité pour les huiles de *Pinus halepensis*.

Plusieurs études ont évalué le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles du Pin d'Alep qui ont révélé une importante activité (Hmamouchi et al., 2001 ; Abi Ayed et al., 2011 ; Ghanemi et al., 2013 ; Ghalem, 2014 ; Mohareb et al., 2016 ; Bouyahya et al., 2019). Toutes les souches bactériennes testées dans cette étude ont montré un certain degré de sensibilité aux huiles essentielles à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* qui ont montrés une résistance. Les huiles des populations étudiées ont montré que les huiles du pin sont inefficaces contre les souches *S. aureus*, *B. cerus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. Les mêmes résultats sont obtenus par Abi Ayad et al., (2011) et Mitić et al., (2019), qui ont observé une sensibilité plus importante chez *S. aureus* que chez *E. coli* et *P. aeruginosa* vis-à-vis des HEs de *P. halepensis*.

Les études antérieures rapportent la grande sensibilité de *S. aureus* à l'huile essentielle de *P. halepensis*. On peut supposer que le composé majeur de l'huile de *P. halepensis* testée, le (E)

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

–caryophyllène (29.06% de la teneur totale en huile) est responsable de l'efficacité antimicrobienne contre cette souche. La Haute activité de ce composé contre *S. aureus* a déjà été confirmée dans les études de Dahham *et al.*, (2015) et Mitić *et al.*, (2019).

La différence des diamètres d'inhibition pourrait être due principalement à la composition chimique des huiles essentielles et l'activité antibactérienne de ces dernières pourrait principalement être due aux composés majoritaires. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines (Bassolé et Juliani ; 2012 ; Swamy *et al.*, 2016). Les huiles essentielles sont composées de plusieurs composants et leur activité antimicrobienne ne peut être confirmée sur la base de l'action d'un seul composé (Bajpai *et al.*, 2012).

Les bactéries Gram<sup>+</sup> se sont montrées plus sensibles aux huiles testées que les bactéries Gram négatif. Ceci peut être dû aux différences des caractéristiques entre les parois des deux types de bactéries, en effet les bactéries Gram négatives possèdent une résistance intrinsèque aux agents antimicrobiens du à la nature de leurs membranes externes (Yap *et al.*, 2014 ; Aelenei *et al.*, 2016). Ces membranes sont composées de lipopolysaccharides formant une barrière imperméable aux composés hydrophobes (Zguraskaya *et al.*, 2015). Généralement les travaux portant sur la recherche d'activité antibactérienne chez les plantes révèlent une plus forte sensibilité des bactéries à Gram<sup>+</sup> que des bactéries à Gram<sup>-</sup> (Murbach *et al.*, 2014).

Une activité antibactérienne est enregistrée sur les souches *P. aeruginosa* et *K. pneumoneae*, les mêmes observations ont été émises sur les souches *S. aureus*, *B. cerus*, *L. monocytogenes*, *K. pneumoneae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* et *S. typhimurium* par Fekih *et al.* (2014). Dans l'ensemble, le mécanisme d'action antibactérien est favorisé par une série de réactions biochimiques dans la cellule bactérienne, qui dépendent du type et des caractéristiques des constituants chimiques présents dans l'huile essentielle (Nazzaro *et al.*, 2013). Plusieurs auteurs attribuent principalement le fort pouvoir antimicrobien des terpènes aux composés terpéniques oxygénés (Van *et al.*, 2006). En effet, plusieurs études ont montré que les composés terpéniques hydrocarbonés possèdent relativement une plus faible capacité antimicrobienne (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Nazzaro *et al.*, 2013 ; Chouhan *et al.*, 2017). La composition chimique de l'huile essentielle de *P. halepensis*, utilisée dans ce travail, est dominée par la présence de monoterpènes hydrocarbonés. Les relations, corrélant l'activité antibactérienne des huiles essentielles à leurs principaux constituants, sont applicables à l'huile de *P. halepensis* car les composés hydrocarbonés sont généralement peu, voire pas, actifs (Guimarães *et al.*, 2019). Ces propriétés agissent en s'attaquant à la membrane plasmique, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité et la perte de constituants cellulaires (Denyer et Hugo, 1991; Sikkema *et al.*,

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

1994). Jordán *et al.*, (2013) mentionnent qu'une forte proportion d' $\alpha$ -pinène augmente l'efficacité des huiles essentielles du romarin contre *Staphylococcus aureus*, ce qui concorde avec nos résultats et les résultats de Semerdjieva *et al.*, (2019).

Les alcools terpéniques sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car solubles dans les milieux aqueux et ils provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes (Bassolé et Juliani, 2012). Ce qui confirme nos résultats pour la station de Tafrent qui possède le taux le plus élevé en Terpinen-4-ol.

L'huile de la population de Bir ghzala, possède le taux le plus élevé d' $\alpha$ -terpinène, elle a un pouvoir important pour inhiber les souches *E.coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumonie*, *S. enteric*, *B.cerus* et *P. mirabilis*. Ce pouvoir inhibiteur est dû à la richesse en  $\alpha$ -terpinène (Dorman et Deans, 2000 ; De Morais *et al.*, 2018 ; Bezerra *et al.*, 2019).

Les différences d'efficacité et du pouvoir antibactérien observées pourraient être dues principalement à la composition chimique des huiles essentielles, qui varient d'une part en fonction de la plante, et d'autre part en fonction de la région géographique, de la saison, du stade, de l'organe et de la méthode d'extraction (Wińska *et al.*, 2019 ; Limam *et al.*, 2020).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle du Pin d'Alep peut être attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatiles ; les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires, Ceci est confirmé par plusieurs études (Al-Bayati, 2008; Randrianarivelo *et al.*, 2009; Hmamouchi *et al.*, 2001 ; Aidi Wannas *et al.*, 2021).

Les composés majeurs, les composants secondaires interagissent entre eux pour donner un effet sur les activités antimicrobiennes des huiles essentielles (Zeng *et al.*, 2012; Ashmawy *et al.*, 2020). Certaines études ont conclu que les composants mineurs jouent un rôle sur l'activité et peuvent avoir un effet ou une influence sur l'huile essentielle (Li *et al.*, 2019; Miladinović *et al.*, 2021). Plusieurs travaux ont rapporté que les bactéries Gram (+) sont plus susceptibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram (-) (Xianfei *et al.*, 2007; Sandri *et al.*, 2007; Zarai *et al.*, 2011; Al-Bayati, 2008 ; Raut et Karuppaiyil, 2014).

Le mécanisme d'action antibactérien est favorisé par une série de réactions biochimiques dans la cellule bactérienne, qui dépendent du type et des caractéristiques des constituants chimiques présents dans l'huile essentielle (Nazzaro *et al.*, 2013),

Bien que les mécanismes associés aux activités antimicrobiennes des huiles essentielles ne soient pas entièrement compris (Murbach *et al.*, 2014 ; Swamy *et al.*, 2016) ; le nombre d'études à ce sujet a augmenté au cours de ces dernières décennies (Karapandzova *et al.*, 2012 ; Šarac *et al.*, 2014 ; Bouyahya *et al.*, 2019 ; Oyewole *et al.*, 2021). Il semblerait que le mode d'action



de la majorité des composés suscités est de rendre, de part leurs propriétés lipophiles, la membrane cytoplasmique bactérienne et fongique perméable. C'est le cas du thymol, myrcène, limonène et  $\beta$ -phellandrène, par exemple (Cowan, 1999 ; Filipowicz *et al.*, 2003; Elaissi *et al.*, 2012 ; De Araújo *et al.*, 2020). Ces derniers peuvent en outre, désactiver les enzymes essentielles et perturber la fonctionnalité du matériel génétique, la production d'énergie et la synthèse des composants structuraux (Mutlu-Ingok, 2020 ; Hou *et al.*, 2022). Le *p*-cymène semble également agir sur la membrane cellulaire mais avec un autre mécanisme ; il s'accumule en grandes quantités et provoque l'expansion des phospholipides membranaires en augmentant les espaces par lesquels des fuites d'ions pourraient avoir lieu (Marchese *et al.*, 2017). Les pinènes peuvent quant à eux, détruire l'intégrité cellulaire en inhibant la respiration et les processus de transport ionique. En outre, ils peuvent augmenter la perméabilité des mitochondries isolées chez les levures (Tariq *et al.*, 2019). Par ailleurs, le thymol peut agir contre les champignons en altérant la morphologie des hyphes et en formant des agrégats, ce qui entraîne une réduction des diamètres des hyphes et la lyse de la paroi car il interagit avec la membrane fongique (Kowalczyk *et al.*, 2020).

#### IV. Activité antioxydant des huiles essentielles de *P. halepensis*

Il n'existe aucune méthode unique qui est capable d'évaluer pleinement la capacité antioxydant totale ou de donner une prédiction complète de l'efficacité antioxydant des différents composés, puisque les antioxydants peuvent agir par différents mécanismes. L'activité antioxydant des huiles essentielles des 15 populations de *P. halepensis* a été évaluée en utilisant le pouvoir réducteur et leur capacité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH. Le BHT a été utilisé comme antioxydant de référence pour l'estimation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles des populations étudiées.

##### IV.1 Variabilité de l'activité antioxydant des huiles essentielles

Les valeurs des pourcentages d'inhibitions du radical DPPH pour les différentes concentrations des huiles obtenus (**Tableau 15**), ont permis de tracer les courbes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations du BHT et des huiles essentielles des différentes populations (**Figure 19**).

Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour le BHT ou pour les huiles testées (Figure 24). Pour une concentration de 1 mg/ml, le

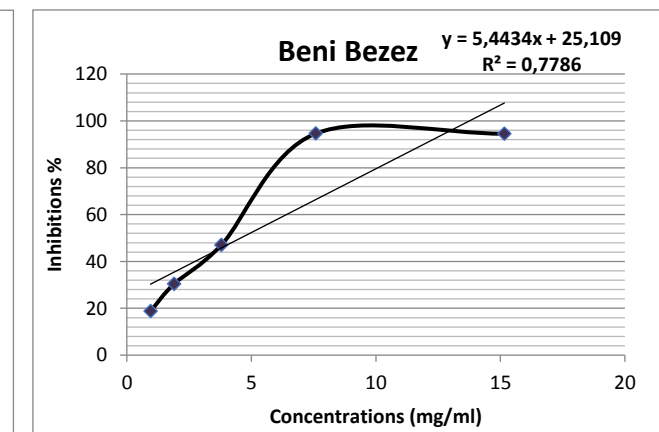
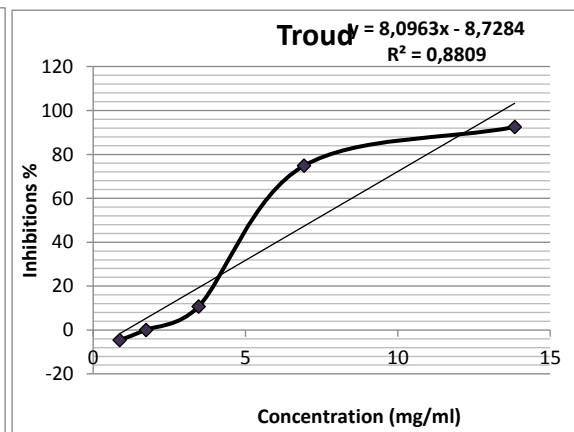
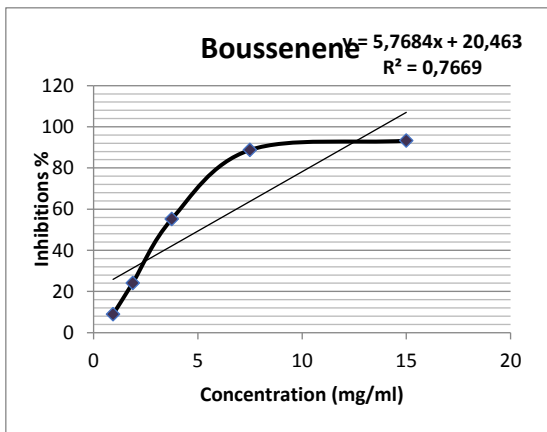
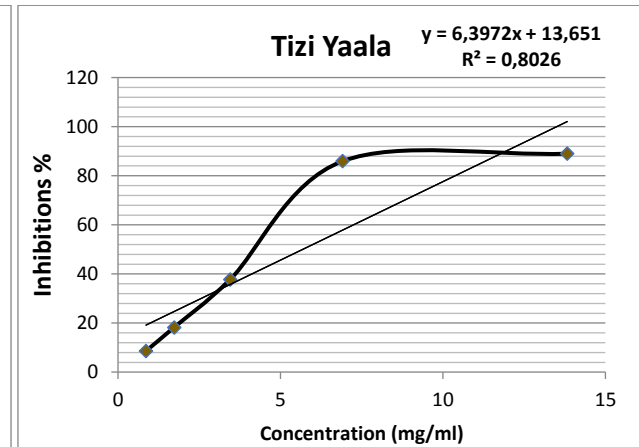
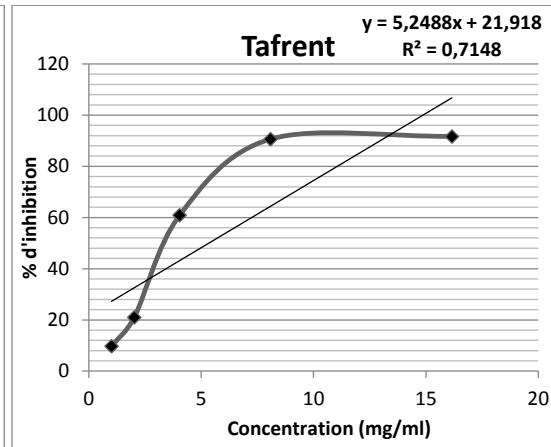
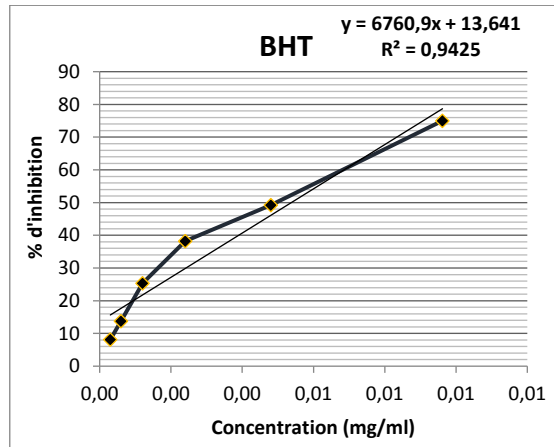
## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

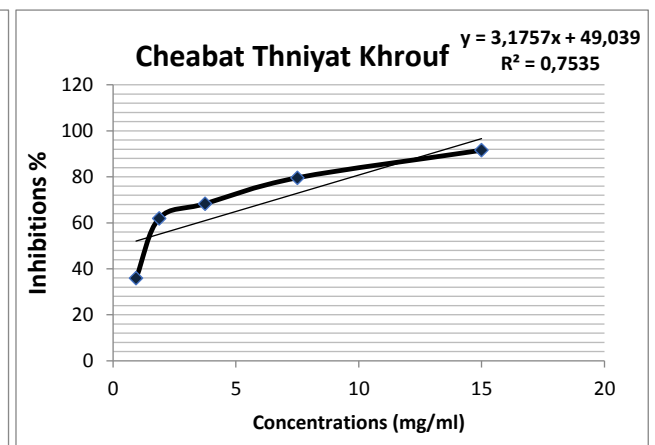
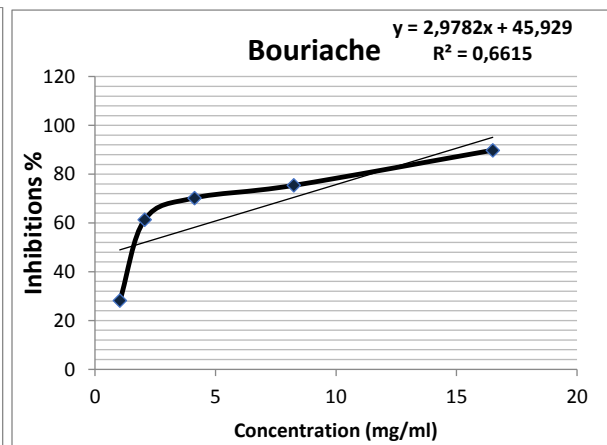
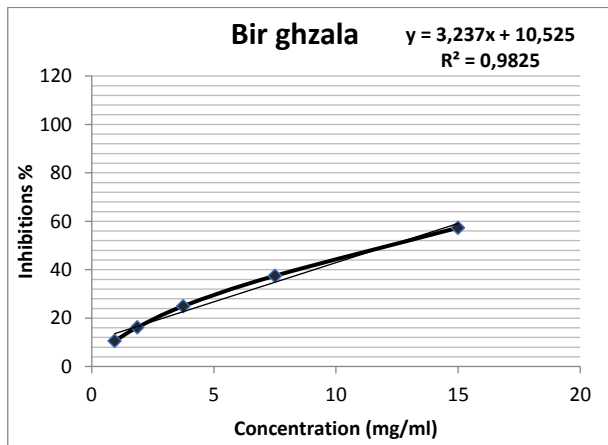
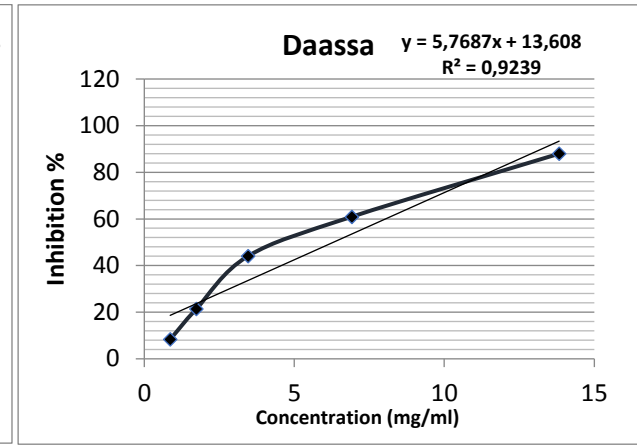
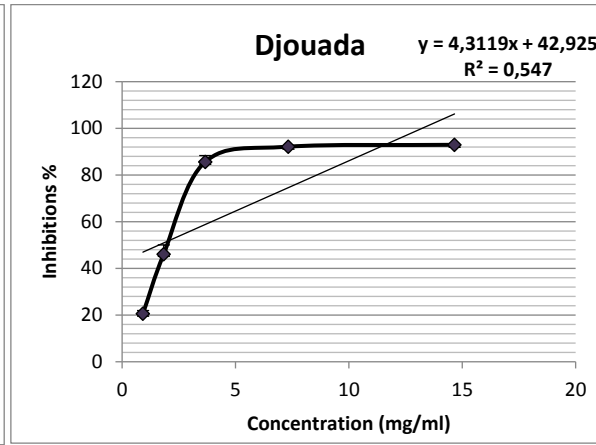
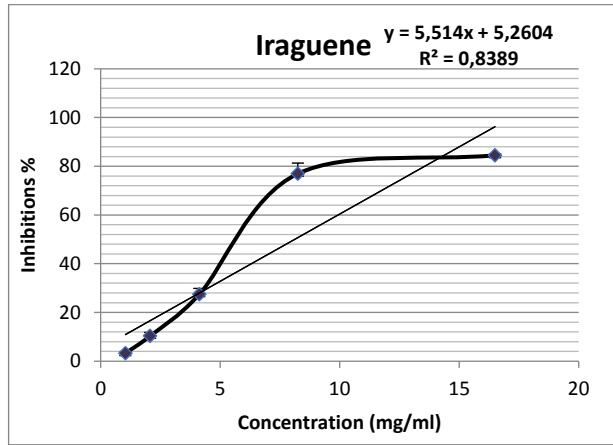
BHT a révélé un pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de 92,08%, tandis que pour les concentrations des huiles essentielles de Boussenene (15 mg/ml), Beni bezez (15,16 mg/ml) et Chikda (13,83 mg/ml) les pourcentages d'inhibition obtenus sont de  $93,217 \pm 0,097$ ,  $94,532 \pm 0,562$  et  $93,168 \pm 0,414$ , respectivement.

**Tableau 15.** Pourcentages d'inhibition des huiles essentielles du *Pinus halepensis*.

Dilutions Stations	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Tafrent	91,697±0,650	90,598±0,370	60,867±8,887	21,032±1,786	9,737±0,903
Tizi yaala	89,034±0,054	85,989±0,108	37,807±0,194	18,235±0,108	8,605±0,108
Boussenene	93,217±0,097	88,695±0,244	55,103±0,056	24,063±2,891	8,882±0,753
Troud	92,460±0,297	74,822±8,790	10,712±3,475	0,032±2,627	-4,693±1,457
Beni bezez	94,532±0,562	94,595±0,323	47,033±2,695	30,444±2,803	18,826±3,595
Djouada	92,892±0,106	92,096±0,401	85,570±2,722	46,048±3,946	20,496±1,436
Iraguene	84,528±0,567	76,980±4,383	27,462±2,449	10,345±1,407	3,262±0,484
Daassa	87,476±1,934	59,288±4,149	41,715±9,279	18,026±0,148	4,531±0,498
Bir ghzala	57,379±1,622	37,508±1,293	24,984±1,804	16,214±2,336	10,615±0,244
Bouriache	89,773±5,781	75,372±3,840	70,227±0,716	61,359±0,841	28,123±3,074
Cheabt Thniat khrouf	91,583±0,492	79,607±0,416	68,330±1,048	61,976±1,372	35,995±1,592
Ain Laaneb	69,722±4,398	64,083±0,382	48,861±5,771	33,417±0,382	20,472±0,867
Sidi Amor	93,072±0,478	69,400±7,186	38,614±4,094	16,216±1,696	11,556±0,740
Chikda	93,168±0,414	89,246±2,468	59,835±2,678	20,374±0,652	7,629±1,277
Seriana	90,074±0,842	87,653±2,541	54,626±10,860	19,975±2,574	12,592±1,060
BHT	92,079±1,741	91,089±0	86,798±0,571	74,917±2,061	49,174±1,512

Ces pourcentages correspondent à une inhibition totale du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet au jaune pâle. On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle est inférieur à celui du BHT pour toutes les concentrations utilisées.





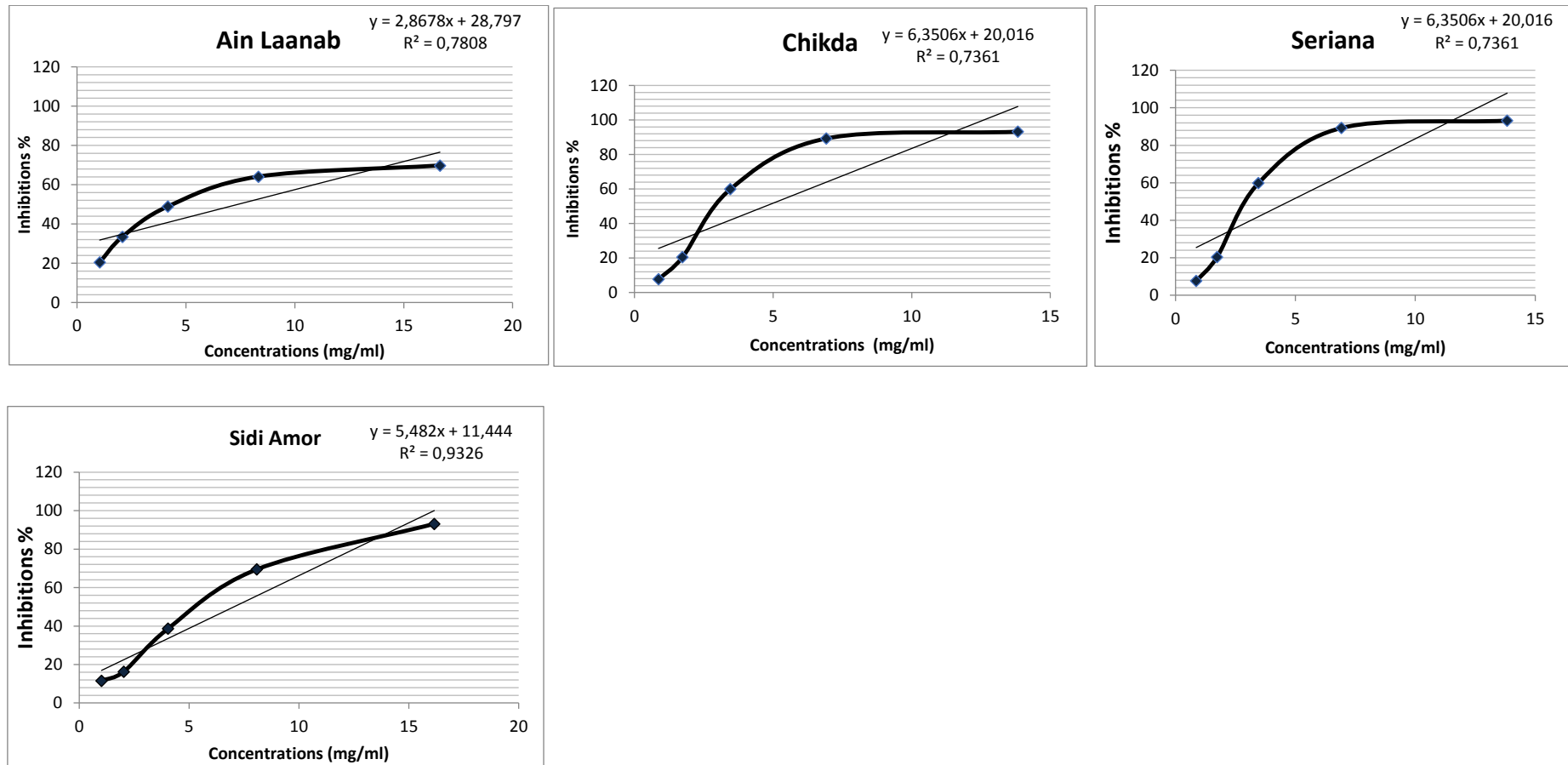


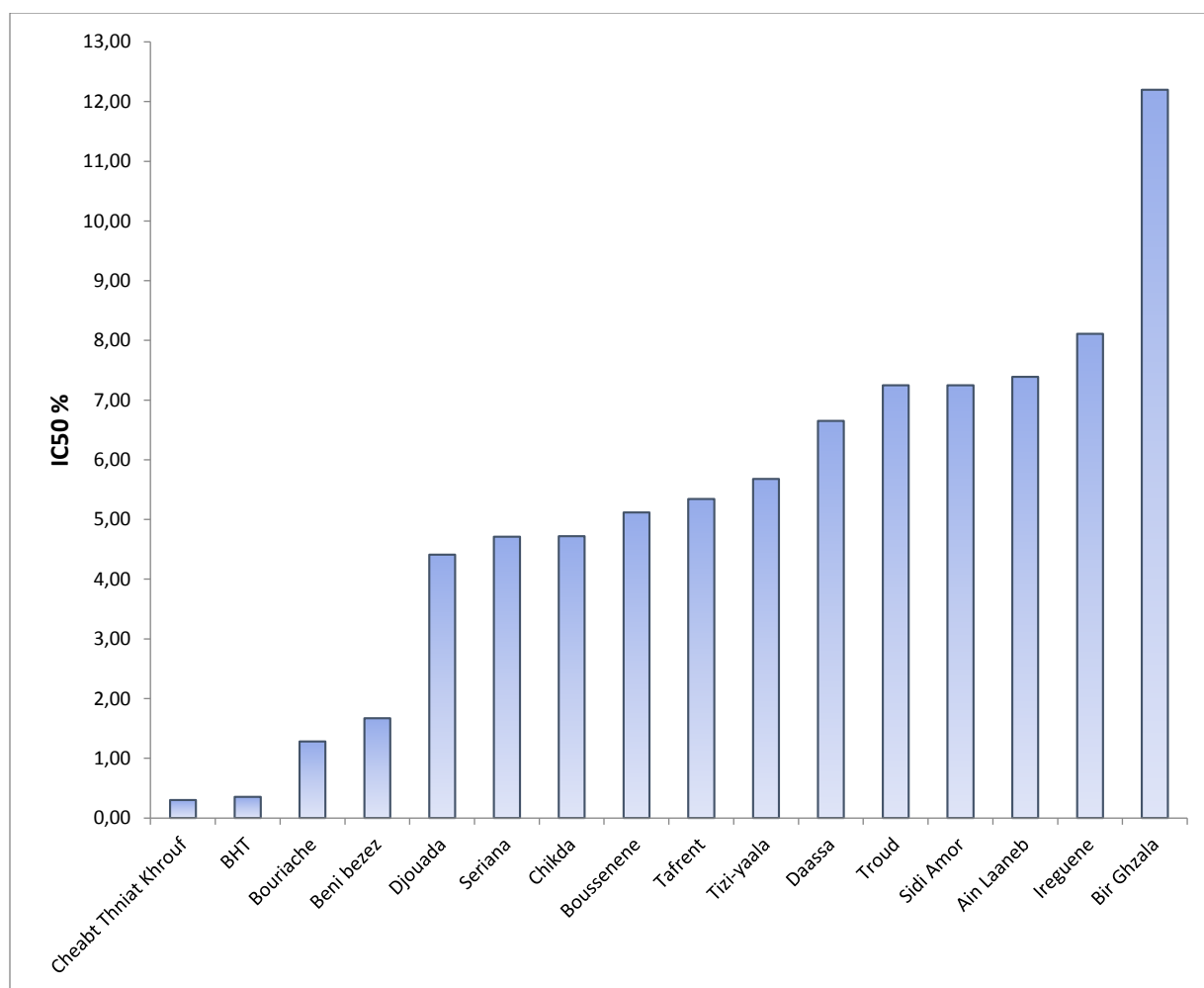
Figure 19. Pourcentages d'inhibition du DPPH par les huiles essentielles et le BHT.

L'IC<sub>50</sub> est inversement lié à la capacité antioxydante d'une HE, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de radical libre de 50%, plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante est grande. L'activité antioxydante des huiles essentielles de *P. halepensis* évaluée par DPPH est exprimée en IC<sub>50</sub> (**Tableau 18**).

**Tableau 16.** Valeurs d'IC<sub>50</sub> des huiles essentielles de *P. halepensis*.

Satations	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Seriana	4,71± 0,13
Djouada	4,41± 0,19
Beni bezez	1,67± 0,56
Ireguene	8,11± 0,03
Daassa	6,65± 0,22
Bir Ghzala	12,2± 0,24
Bouriache	1,28±0,55
CheabtThniatKhrouf	0,30± 0,22
Ain Laaneb	7,39± 0,17
Sidi Amor	7,25± 0,24
Chikda	4,72± 0,13
Boussenene	5,12± 0,1
Troud	7,25± 0,24
Tizi-yaala	5,68± 0,01
Tafrent	5,345±0,30
BHT	0,355±0,0034

Les tests révèlent que les huiles présentent des capacités de neutralisation des radicaux libres qui varient selon les provenances du Pin d'Alep (**Figure 20**). L'activité la plus élevée est obtenue avec l'huile de la provenance de Cheabet Thniat Khrouf avec une IC<sub>50</sub> de (0,30± 0,22) mg/mL, suivi par celle de la provenance Bouriache avec une IC<sub>50</sub> de 1,28±0,55 mg/mL, Tandis que, l'activité la plus basse a été obtenue avec l'huile de la provenance de Bir Ghzala avec une IC<sub>50</sub> de 12,2± 0,24 mg/mL. Le contrôle positif BHT est le plus fort antioxydant avec une valeur IC<sub>50</sub> de 0,335 mg/mL.



Les valeurs des  $IC_{50}$  sont exprimées en mg/mL (Moyenne  $\pm$  écart-type, en triplicate).

**Figure 20** : Activité antiradicalaire des huiles essentielles de *P. halepensis*

Les HES de nos populations montrent des différences significatives dans leurs capacités de piégeage du radical libre. L'huile de la population Chabat Thniat khrouf est plus active que le BHT et peut réduire le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) violet endiphényl-picrylhydrazine jaune avec un  $IC_{50}$  de  $0,30 \pm 0,22$  mg/ml. Les HES des populations Bir Ghzala et Ireguene étaient les moins actives, en comparaison avec l'activité antioxydant de la substance de référence (BHT), la majorité des HES de *Pinus halepensis* étaient moins efficaces. Le BHT présente un  $IC_{50}$  très inférieur de  $0,355 \pm 0,0034$  mg/ml.

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### Analyse statistique ANOVA de l'activité anti-oxydant

Les résultats montrent des différences très hautement significatives entre les populations et les dilutions testés (Tableau 17).

**Tableau 17.** Principaux facteurs et interactions des huiles essentielles de *P. halepensis* de l'activité antioxydant.

Source	df	F	P
<b>Facteurs</b>			
Populations	15	29,491	,0000 ***
Dilutions	8	181,648	,0000 ***

LSD 0,05 = 9,310

En comparant la capacité antioxydante de nos huiles avec celle du BHT à réduire le DPPH, on constate que les résultats sont faibles, il n'existe aucune différence significative entre les populations et le BHT ( $p < 0.0001$ ).

Le calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées en fonction de leurs dilutions révèle une décroissance de la couleur violette au cours du temps dans les différentes concentrations testées à des degrés variables (Tableau 20).

**Tableau 18.** Effet des différentes concentrations des huiles et du BHT sur le pourcentage d'activité antioxydante.

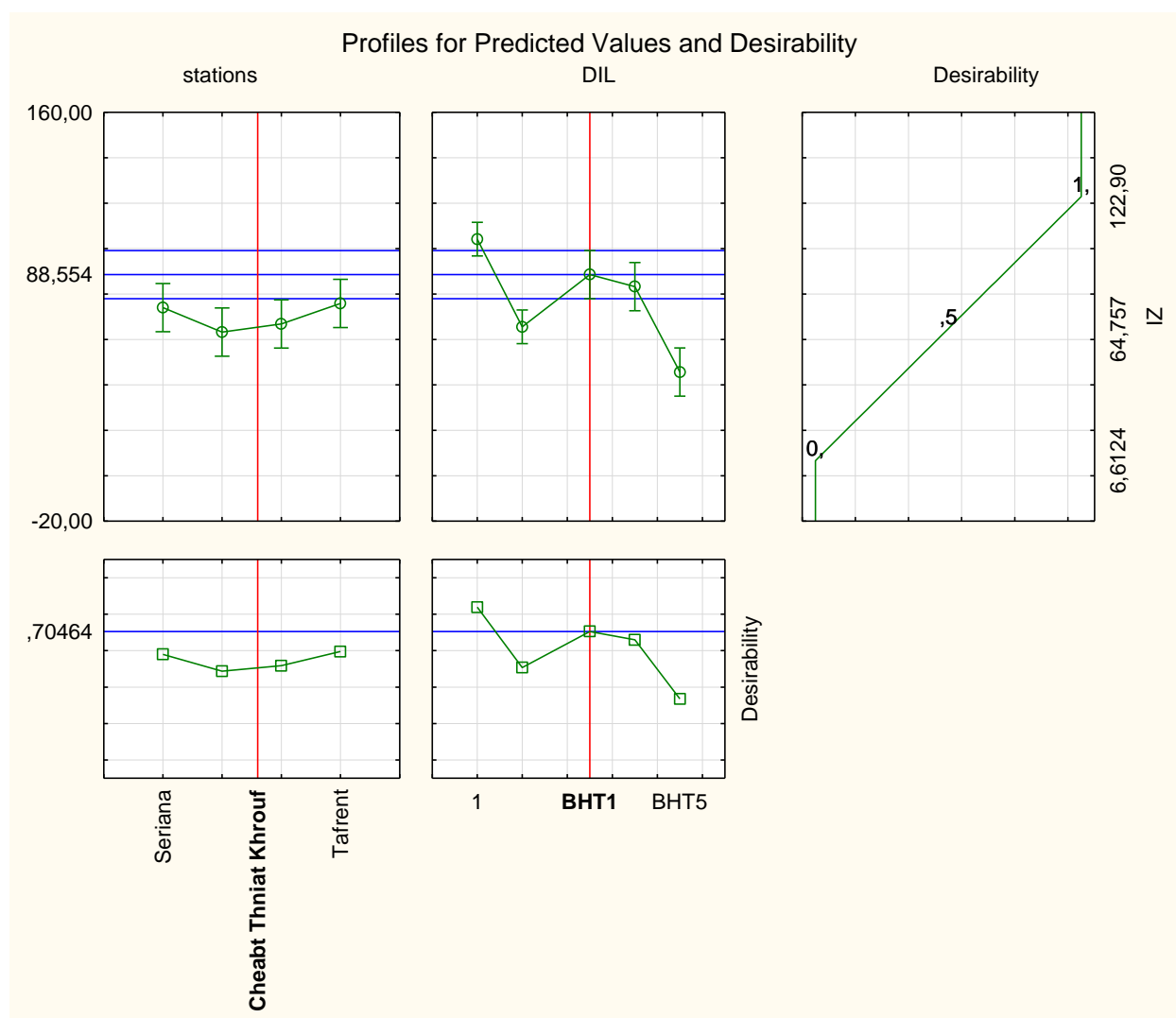
Rang	Dilutions	Pourcentages d'inhibition	n	Groupes significants				
1	BHT1	92,079	15	a				
2	BHT2	91,089	15	a				
3	1/2	87,373	15	a				
4	BHT3	86,798	15	a				
5	1/4	77,728	15		b			
6	BHT4	74,917	15		b			
7	BHT5	49,174	15			c		
8	1/8	48,783	15			c		
9	1/16	26,517	15				d	
10	1/32	13,108	15					e

Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec la concentration des huiles et du BHT. Le plus grand pourcentage de réduction du DPPH a été détecté pour la dilution 1/2 (v/v d'huile et de méthanol). Les dilutions (1/16 et 1/32) montrent des pouvoirs antioxydants moindres avec des pourcentages de réductions de 26,517 et 13,108 respectivement. L'huile essentielle de *Pinus halepensis* de la région de Beni Bezez présente le plus grand pourcentage d'inhibition du radical DPPH, tandis que l'huile de la population de Ain Laanab est la moins active.



### Test de désirabilité

Le profil de désirabilité des huiles essentielles de *P. halepensis* donne une valeur de prédiction de 0,704 (Figure 21). Toutes les huiles essentielles des populations de *Pinus halepensis* ont des valeurs inférieures à la valeur de prédiction, dilution 1/2 a une activité anti-oxydante importante avec des valeurs supérieures à la valeur prédite, alors que le BHT utilisée comme témoin positif a une valeur égale à la valeur de prédiction.



**Figure 21.** Profil de désirabilité de l'activité antioxydant des huiles essentielles de *Pinus halepensis*.

L'effet antioxydant des huiles de *P. halepensis* a été évalué in vitro par le test DPPH. La capacité antioxydante des différentes huiles a été déterminé à partir de l'CI50. Plusieurs études visant à évaluer le potentiel biologique de différentes espèces de pins ont été rapporté par la

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

littérature. Ces travaux se penchent particulièrement sur le potentiel antioxydant (Djerrad *et al.*, 2015 ; Ustun *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent que toutes les huiles essentielles testées sont capables de réduire le radical DPPH. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés par Ustun *et al.*, (2012) sur les huiles essentielles des espèces du genre *Pinus*. Djerrad *et al.* (2017), ont montré que l'huile essentielle de *P.halepensis* d'Algérie possède des activités antioxydants importantes. Le potentiel antioxydant des huiles essentielles de genre *Pinus* de la Chine ont montré des activités antioxydantes acceptables (Xie *et al.*, 2015). Au Maroc, Bouyahya *et al.*, (2019), ont évalué l'activité antioxydante des huiles essentielles de *P. halepensis* et trouvent une activité antioxydante remarquable. Les mêmes constatations ont été trouvées par Aidi Wannas *et al.*, (2020) en étudiant l'activité antioxydant des huiles du Pin de la Tunisie. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique des jeunes cônes ont également démontré une activité antiradicalaire importante (Meziti *et al.*, 2019).

Les aiguilles juvéniles du Pin d'alep ont montré l'activité antioxydante la plus élevée, les inflorescences possédaient une activité chélatrice importante (267,43 mg eq EDTA/g HE) (Khouja *et al.*, 2020). Ces études suggèrent que la variation de l'activité antioxydante entre les échantillons des huiles essentielles du Pin d'Alep s'expliquent principalement par les différences qualitatives et quantitatives dans leurs profils chimiques (Amri *et al.*, 2013; Fekih *et al.*, 2014 ; Ustun *et al.*, 2012). Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants (Oussou *et al.*, 2009 ; Oussou *et al.*, 2010; Saint, 2003 ; Kalemba et Kunicka, 2003). En général, les huiles essentielles riches en composés oxygénés présentent une activité anti radicalaire plus marquée que celles à terpènes hydrocarbonés (Benov, 1994). En effet, les huiles essentielles d'*A. millefolium* et *A. absinthium* ont présenté une plus grande activité antioxydante grâce à leurs richesses en monoterpènes oxygénés (Vidic *et al.*, 2016). Dans l'ensemble, cette variabilité suggestive des activités antioxydantes parmi les huiles essentielles de *P. halepensis* récoltées à différentes régions ont conduit à conclure que nous devrions sélectionner les huiles essentielles à étudier avec soin en fonction de l'altitude, afin d'avoir la plus grande efficacité de l'huile essentielle en termes d'activités biologiques à des fins de santé humaine.

On peut déduire que l'activité antioxydante des huiles essentielles des plantes étudiées serait probablement liée aux composants majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants (Lahlou , 2004 ; Bouzouita *et al.*, 2008 ; Oussou *et al.*, 2010, Dawidowicz et Olszowy, 2014 ; Khodaei *et al.*, 2021) et même aussi les composés minoritaires qui peuvent

## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

---

interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Islam *et al.*, 2018 ; Ouknin *et al.*, 2019).

# *CONCLUSION*

## Conclusion

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de notre laboratoire de Valorisation des Ressources Biologiques Naturelles (Université Ferhat Abbas Sétif 1). Cette recherche porte sur l'étude phytochimique et les activités biologiques du *pinus halepensis* de l'Est Algérien. Les résultats de caractérisation chimique des huiles essentielles montrent une grande variabilité des rendements en huile essentielle avec des pourcentages allant de 0,22 à 1,34 %. Cette variabilité en rendement peut être due à plusieurs facteurs, dont l'origine géographique, la période de récolte ainsi le temps de séchage.

La composition chimique des huiles essentielles extraites des parties aériennes de *P. halepensis* provenant de quinze provenances l'Est Algérien a fait l'objet d'une étude détaillée par une analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/FID et CPG/MS).

L'analyse des quinze populations nous a montré que l'huile de *P. halepensis* a permis l'identification de trente-sept composés représentant un pourcentage de  $(99,40 \pm 0,5\%)$  de l'huile totale. Les huiles sont avérées riches en monoterpènes hydrocarbonés ( $51,45 \pm 19,36\%$ ) suivi par les sesquiterpènes hydrocarbonés ( $37,14 \pm 12,55\%$ ). Les composés majoritaires de ces huiles sont le  $\beta$ -caryophyllène-E ( $29,06 \pm 8,5\%$ ), mycène ( $19,14\% \pm 6,67\%$ ),  $\alpha$ -pinène ( $16,86 \pm 3,35\%$ ). Cependant les esters sont présents à un taux de  $(5,88 \pm 2,88\%)$ , les diterpènes représentent une moyenne de  $2,67 \pm 2,63\%$ . Les sesquiterpènes oxygénés et les monoterpènes oxygénés sont très minoritaires dans toutes les huiles essentielles analysées avec des moyennes de  $(1 \pm 1,8\%)$  et  $(1,27 \pm 1,45\%)$  respectivement.

Il ressort de cette étude que les localités sont caractérisées par des compositions chimiques différentes, dont quatre chémotypes ont été identifiés : chémotype à Sabinène -  $\Delta^3$ -carene - terpinolène caractérise la provenance de Tafrent, chémotype à  $\beta$ -caryophyllène-E -  $\alpha$ -humulène caractérise les populations de Beni Bezez et Daassa, chémotype à  $\beta$ -caryophyllène-E -  $\alpha$ -pinène -  $\alpha$ -humulène caractérise les populations de Chabet Thniyat Khrouf ; Bouriache; Bousenène; Ain Laanab; Djouada; Bir ghzala; Iraguène; Chikda et Seriana et chémotype à  $\beta$ -caryophyllène-E -  $\alpha$ -pinène - myrcène caractérise les provenances de Sidi Amor; Troud et Tizi Yaala. La variabilité chimique est étroitement liée à la différence géographique des provenances étudiées et les conditions climatiques. Ceci pourrait signifier que les facteurs climatiques sont considérés comme les facteurs les plus responsables de l'existence des différents chémotypes dans différentes zones géographiques.

Les tests antibactériens des HEs effectués, par la méthode de diffusion en disque et la dilution, sur les souches bactériennes suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumonia* (ATCC 700603), *Salmonella entericspp. arizonae* (CIP 81-3), *Listeria innocua* (clip 74915), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), et *Bacillus cereus* (ATCC 11778) ont donné une bonne activité antimicrobienne, sauf pour *E. coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) qui se sont avérés résistantes. Les huiles essentielles ont également montré que les fractions riches en composés oxygénés possèdent une meilleure activité antibactérienne.

D'autre part, l'activité antioxydant des huiles est, également, testée avec la méthode de réduction relative du radical (DPPH). Le test montre un pouvoir antioxydant modéré des huiles essentielles.

### **Perspectives**

Il serait intéressant de développer ces recherches d'un point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur la composition et les propriétés biologiques de l'huile de *Pinus halepensis*, et ceci va se baser sur :

Evaluer l'influence d'autres méthodes d'extraction sur le rendement et la phytochimie de l'huile essentielle.

Etendre cette étude a bon nombre d'huiles essentielles sur des bactéries multi-résistantes, notamment les staphylocoques résistants à la méticilline.

Elargir l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens à d'autres tests plus avancés.

Identifier les molécules bioactives spécifiques pour chaque activité biologique de l'huile.

*REFERENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUES*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbad, A., Sfairi, Y., Lahcen, H., Bekkouche, K., Markouk, M., Wohlmuth, H., & Leach, D. (2013). Intraspecific chemical variability of essential oil from leaves of *Cupressus atlantica* Gaussen, an endemic and endangered coniferous species in Morocco. *Natural Product Research*, 27(6), 579-582.
- Abbou, A., Kadri, N., Dahmoune, F., Chergui, A., Remini, H., Berkani, F., ... & Madani, K. (2020). Optimising functional properties and chemical composition of *Pinus halepensis* Mill. Seeds protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 100, 105416.
- Abdalla, S., Pizzi, A., Ayed, N., Charrier-El Bouhtoury, F., Charrier, B., Bahabri, F., & Ganash, A. (2014). MALDI-TOF analysis of Aleppo pine (*Pinus halepensis*) bark tannin. *BioResources*, 9(2), 3396-3406.
- Abdollahzadeh E., Rezaei M., Hosseini H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35, 177-183.
- Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F. Z., Lazzouni, H. A., Rebiahi, S. A., & Ziani\_Cherif, C. (2011). Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5433-5436.
- Adlercreutz, H., Mazur, W., Heinonen, S. M., & Stumpf, K. (2002). Phytoestrogens and breast cancer. *Breast Cancer*, 549-576.
- Adlercreutz, H., Mazur, W., Heinonen, S. M., & Stumpf, K. (2002). Phytoestrogens and breast cancer. *Breast Cancer*, 549-576.
- Aelenei, P., Miron, A., Trifan, A., Bujor, A., Gille, E., & Aprotosoiaie, A. C. (2016). Essential oils and their components as modulators of antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Medicines*, 3(3), 19.
- Aidi Wannas, W., Dakhlaoui, S., Limam, H., Tammar, S., & Msaada, K. (2021). Chemical profile, allelopathic, antibacterial and antioxidant potential of the essential oil from Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller) needles. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54(19-20), 2483-2499.
- Aissi, O., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2016). Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 91, 56-65.
- Al-Bayati, F. A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 116(3), 403-406. DOI : 10.1016/j.jep.2007.12.003.
- Al-Bazaz, H. K., Al-jubori, I. S., Eldalawy, R., & Nasser, N. M. (2018). Antimicrobial and Antioxidant Activity *Pinus halepensis* Miller. Cone Extract which grown in Iraq. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(11), 4977-4980.
- Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601-611.
- Al-Ismail, K., Al-Assoly, N., & Saleh, M. (2018). Extraction and functional characterization of isolated proteins from Aleppo pine seeds (*Pinus halepensis* Mill.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 386-394.
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of ethnopharmacology*, 133(3), 945-972. DOI: 10.1016/j.jep.2010.11.055.
- Aloui, F., Baraket, M., Jedidi, S., Hosni, K., Bouchnak, R., Salhi, O., ... & Abbes, C. (2021). Chemical Composition, Anti-radical and Antibacterial Activities of Essential Oils from Needles of *Pinus halepensis* Mill., *P. pinaster* Aiton., and *P. pinea* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(3), 453-460.
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraji3n-Catal3n, E., Herranz-L3pez, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153626.
- Amorati, R., & Foti, M. C. (2012). Oxidative stability and antioxidant properties of essential oils. *Essential Oils as Natural Food Additives; Valgimigli, L., Ed.; Nova Science: New York, NY, USA*, 75-95.
- Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Gargouri, S., Fezzani, T., & Jamoussi, B. (2013). Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological agriculture & horticulture*, 29(2), 91-106. a
- Amri, I., Hanana, M., Jamoussi, B., & Hamrouni, L. (2017). Essential oils of *Pinus nigra* JF Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3877-S3882. B.
- Arora, R., Singh, B., Vig, A. P., & Arora, S. (2016). Conventional and modified hydrodistillation method for the extraction of glucosinolate hydrolytic products: A comparative account. *SpringerPlus*, 5(1), 1-4.
- Asensio, D., Owen, S. M., Llusia, J., & Penuelas, J. (2008). The distribution of volatile isoprenoids in the soil horizons around *Pinus halepensis* trees. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(12), 2937-2947.
- Ashmawy, N. A., Al Farraj, D. A., Salem, M. Z., Elshikh, M. S., Al-Kufaidy, R., Alshammari, M. K., & Salem, A. Z. (2020). Potential impacts of *Pinus halepensis* Miller trees as a source of phytochemical compounds: Antibacterial activity of the cones essential oil and n-butanol extract. *Agroforestry Systems*, 94(4), 1403-1413.
- Aydin, E., T3rkez, H., & Taşdemir, Ş. (2013). Anticancer and antioxidant properties of terpinolene in rat brain cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64(3), 415-424.
- Azevedo, N. R., Campos, I. F., Ferreira, H. D., Portes, T. A., Santos, S. C., Seraphin, J. C., ... & Ferri, P. H. (2001). Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, 57(5), 733-736.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722-734.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bali, A. S., Batish, D. R., & Singh, H. P. (2016). Allelopathic effect of aromatic plants: Role of volatile essential oils. *J. Global. Biosci*, 5, 4386-4395.
- Balouiri M., Sadiki M., Koraichi Ibsouda S. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71–79.
- Baratta M. T., Dorman H. J. D., Deans S. G., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Ruberto G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- and fragrance journal*, 13(4):235-244.
- Barra, A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural product communications*, 4(8), 1934578X0900400827.
- Baser K. H. C. and Demirci F. (2007). Chemistry of essential oils. In: Berger R.G. (ed.) *Flavours and fragrances – Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin, pp 43-86.
- Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.
- Basholli-Salihi, M., Schuster, R., Hajdari, A., Mulla, D., Viernstein, H., Mustafa, B., & Mueller, M. (2017). Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three *Pinus* spp. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1553-1560.
- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006. DOI : 0.3390/molecules17043989.
- Baydara H. Sağdıç O., Özkanc G., Karadoğan T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15(3):169-172.
- Belkacem, N., Khettal, B., Hudaib, M., Bustanji, Y., Abu-Irmaileh, B., & Amrine, C. S. M. (2021). Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of *Cedrus atlantica* organic extracts and essential oil. *European Journal of Integrative Medicine*, 42, 101292.
- Benderradji, L., Rebbas, K., Ghadbane, M., Bounar, R., Brini, F., & Bouzerzour, H. (2014). Ethnobotanical study of medicinal plants in Djebel messaad region (M'sila, Algeria). *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med*, 3(12), 445-459.
- Benouadah, N., Aliouche, D., Pranovich, A., & Willför, S. (2019). Chemical characterization of *Pinus halepensis* sapwood and heartwood. *Wood Material Science & Engineering*, 14(3), 157-164.
- Bentouati, A. (2006). *Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (Pinus halepensis M.) du massif de Ouled Yagoub (Khenchela-Aurès)* (Doctoral dissertation, Batna, Université El Hadj Lakhdar. Faculté des sciences).
- Berger, R. G. (Ed.). (2007). *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Science & Business Media.
- Berroukche, A., Amara, S., Halimi, S., & Benyamina, F. (2014). Evaluation of the leave and bud decoctions *pinus halepensis* mill effects on the induced-phenol renal toxicity in wistar rats. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 6(2), 197-207.
- Bezerra, J. W. A., Costa, A. R., de Freitas, M. A., Rodrigues, F. C., de Souza, M. A., da Silva, A. R. P., ... & Morais-Braga, M. F. B. (2019). Chemical composition, antimicrobial, modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 58-64. DOI : 10.1016/j.cimid.2019.04.010.
- Boira H. et Blanquer A. (1998) - Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochemical Systematic and Ecology*, 26:811-822.
- Bonnafous, C. (2013). *Traité scientifique aromathérapie: aromatologie & aromachologie*. Éditions Dangles.
- Boudy, P. (1950). *Economie forestière Nord-africaine-Tome 2: monographies et traitements des essences forestières*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Bouyahya, A., Belmehdi, O., Abrini, J., Dakka, N., & Bakri, Y. (2019). Chemical composition of *Mentha suaveolens* and *Pinus halepensis* essential oils and their antibacterial and antioxidant activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(3), 117.
- Bouzenna, H., Samout, N., Amani, E., Mbark, S., Tlili, Z., Rjeibi, I., ... & Hfaiedh, N. (2016). Protective effects of *Pinus halepensis* L. essential oil on aspirin-induced acute liver and kidney damage in female Wistar albino rats. *Journal of oleo science*, 65(8), 701-712.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., & Chaabouni, M. M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
- Božović, M., Garzoli, S., Baldisserotto, A., Romagnoli, C., Pepi, F., Cesa, S., ... & Ragno, R. (2018). *Melissa officinalis* L. subsp. *altissima* (Sibth. & Sm.) Arcang. essential oil: Chemical composition and preliminary antimicrobial investigation of samples obtained at different harvesting periods and by fractionated extractions. *Industrial Crops and Products*, 117, 317-321.
- Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. John Wiley & Sons.
- Brud, W. S. (2020). Industrial uses of essential oils. In *Handbook of Essential Oils* (pp. 1029-1040). CRC Press.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat Faculté de médecine dentaire de Rabat).
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3):223-253.
- Caissard, J. C., Joly, C., Bergougnot, V., Hugueney, P., Mauriat, M., & Baudino, S. (2004). Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Res Dev Cell Biol*, 2, 1-15.
- Camarero, J. J., Sánchez-Salguero, R., Ribas, M., Touchan, R., Andreu-Hayles, L., Dorado-Liñán, I., ... & Gutiérrez, E. (2020). Biogeographic, Atmospheric, and Climatic Factors Influencing Tree Growth in Mediterranean Aleppo Pine Forests. *Forests*, 11(7), 736. DOI: 10.3390/f11070736
- Capuzzo, A., Maffei, M. E., & Occhipinti, A. (2013). Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules*, 18(6), 7194-7238.
- Chambel, M. R., Climent, J., Pichot, C., & Ducci, F. (2013). Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *brutia* Ten.). In *Forest tree breeding in Europe* (pp. 229-265). Springer, Dordrecht.
- Chambel, M. R., Climent, J., Pichot, C., & Ducci, F. (2013). Mediterranean pines (*Pinus halepensis* Mill. and *brutia* Ten.). In *Forest tree breeding in Europe* (pp. 229-265). Springer, Dordrecht.
- Cheikh-Rouhou, S., Hentati, B., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H. (2006). Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international*, 12(5), 407-415. DOI : 10.1177/1082013206069910.
- Chemat, F. and Cravotto, G., 2011. Combined extraction techniques. In *Enhancing Extraction Processes in the Food Industry* (pp. 173-194). CRC Press Taylor and Francis Group

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dublin, Ireland.
- Chemat, F., AbertVian, M., & Dangles, O. (2007). Essential oils as antioxidants. *Int J Essent Oil Ther*, 1, 4-15.
- Chermat, S., & Gharzouli, R. (2015). Ethnobotanical study of medicinal flora in the North East of Algeria-An empirical knowledge in Djebel Zdimm (Setif). *J Mater Sci Eng*, 5, 50-9. DOI : 10.17265/2161-6213/2015.1-2.007.
- Chizzola, R., Michitsch, H., & Franz, C. (2008). Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(16), 6897-6904.
- Chomel, M., Fernandez, C., Bousquet-Mélou, A., Gers, C., Monnier, Y., Santonja, M., ... & Baldy, V. (2014). Secondary metabolites of *Pinus halepensis* alter decomposer organisms and litter decomposition during afforestation of abandoned agricultural zones. *Journal of Ecology*, 102(2), 411-424.
- Chorianopoulos N. G., Evergetis E. T., Aligiannis N., Mitakou S., Nychas G-J. E., Haroutounian S. A. (2007). Correlation between chemical composition of Greek essential oils and their antibacterial activity against food-borne pathogens. *Natural Product Communications*, 2:419-426.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, 4(3), 58. Doi : 10.3390/medicines4030058.
- Christianson, D. W. (2017). Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, 117(17), 11570-11648.
- CLSI, I. (2018). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. *CLSI supplement VET08*.
- Coban, F., Ozer, H., Ors, S., Sahin, U., Yildiz, G., & Cakmakci, T. (2018). Effects of deficit irrigation on essential oil composition and yield of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) in a high-altitude environment. *Journal of Essential Oil Research*, 30(6), 457-463.
- Collin, G. J., Deslauriers, H., Pageau, N., & Gagnon, M. (1993). Essential oil of tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian origin. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 629-638.
- Combrinck, S., Du Plooy, G. W., McCrindle, R. I., & Botha, B. M. (2007). Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of botany*, 99(6), 1111-1119.
- Conde-Hernández, L. A., Espinosa-Victoria, J. R., Trejo, A., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2017). CO<sub>2</sub>-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of food engineering*, 200, 81-86.
- Conner, D. E., & Beuchat, L. R. (1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of food science*, 49(2), 429-434. DOI : 10.1111/j.1365-2621.1984.tb12437.x.
- Correal-Mòdol, E., & Casals, M. V. (2012). Properties of clear wood and structural timber of *Pinus halepensis* from northeastern Spain. *Proceedings of WCTE*, 5, 251-254.
- Cosentino, S. C. I. G., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135. DOI : 10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x.
- COSTA, B. E. T., SANTOS, O. V. D., CORRÊA, N. C. F., & FRANÇA, L. F. D. (2016).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Comparative study on the quality of oil extracted from two tucumã varieties using supercritical carbon dioxide. *Food Science and Technology*, 36, 322-328.
- Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013a). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 22-25. DOI :10.1016/j.actpha.2013.02.006.
- Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013b). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 18-21. DOI: 10.1016/j.actpha.2013.02.005.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582. DOI :10.1128/CMR.12.4.564
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2016). *Natural products from plants*. CRC press.
- Da Silva, R. P., Rocha-Santos, T. A., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51. DOI : 10.1016/j.trac.2015.11.013
- Dafis, S.; Mouloupoulos, C. Einwirkung der Bodenfeuchtigkeit auf das Wachstum und Wurzelbildung von Samlingen der Aleppo und Hartkiefer (*Pinus halepensis* Mill und *P. brutia* Ten). *Beih. Z. Schweiz. Forstver.* **1969**, 46, 225–260.
- Dakhlaoui, S., Bourgou, S., Bachkouel, S., Ben Mansour, R., Ben Jemaa, M., Jallouli, S., ... & Msaada, K. (2021). Essential oil composition and biological activities of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller) needles collected from different Tunisian regions. *International Journal of Environmental Health Research*, 1-15. Doi : 10.1080/09603123.2021.2005001.
- Dakhlaoui, S., Bourgou, S., Bachkouel, S., Ben Mansour, R., Ben Jemaa, M., Jallouli, S., ... & Msaada, K. (2021). Essential oil composition and biological activities of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Miller) needles collected from different Tunisian regions. *International Journal of Environmental Health Research*, 1-15.
- Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2014). Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural product research*, 28(22), 1952-1963.
- De Araújo, A. C. J., Freitas, P. R., dos Santos Barbosa, C. R., Muniz, D. F., Rocha, J. E., da Silva, A. C. A., ... & Coutinho, H. D. M. (2020). GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 111023. DOI : 10.1016/j.fct.2019.111023.
- De MAACK, F., & SABLIER, M. (1994). Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation*, 3(P2614), P2614-1.
- De Moraes Oliveira-Tintino, C. D., Tintino, S. R., Limaverde, P. W., Figueredo, F. G., Campina, F. F., da Cunha, F. A., ... & da Silva, T. G. (2018). Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. *Food chemistry*, 262, 72-77. DOI : 10.1016/j.foodchem.2018.04.040.
- Degryse, A. C., Delpla, I., & Voinier, M. A. (2008). Atelier Santé Environnement, Risques et bénéfices des huiles essentielles. *IGS. EHESP*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Demirci, F., Bayramiç, P., Göger, G., Demirci, B., & BAŞER, K. (2015). Characterization and antimicrobial evaluation of the essential oil of *Pinus pinea* L. from Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 2(2), 39-44.
- Denyer, S. P., & Hugo, W. B. (1991). Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. Society for Applied Bacteriology. Technical Series, 27, 171-187.
- Desjobert, J. M., Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J., & Bernardini, A. F. (1997). Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore corse. *Analisis*, 6(25), M13-M16.
- Dhibi, M., Issaoui, M., Brahmi, F., Mechri, B., Mnari, A., Cheraif, I., ... & Hammami, M. (2014). Nutritional quality of fresh and heated Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil: trans-fatty acid isomers profiles and antioxidant properties. *Journal of food science and technology*, 51(8), 1442-1452.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Dijilani, A.; Dicko, A. The therapeutic benefits of essential oils. In Nutrition, Well-Being and Health; Bouayed, J., Bohn, T., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2012.
- Djerrad, Z., Djouahri, A., & Kadik, L. (2017). Variability of *Pinus halepensis* Mill. Essential oils and their antioxidant activities depending on the stage of growth during vegetative cycle. *Chemistry & Biodiversity*, 14(4), e1600340.
- Djerrad, Z., Kadik, L., & Djouahri, A. (2015). Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 74, 440-449. DOI : 10.1016/j.indcrop.2015.05.049.
- Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 7, 155-179.
- Dob, T., Berramdane, T., & Chelghoum, C. (2007). Essential oil composition of *Pinus halepensis* Mill. from three different regions of Algeria. *Journal of essential oil research*, 19(1), 40-43.
- Dob, T., Berramdane, T., & Chelgoum, C. (2005). Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *Comptes Rendus Chimie*, 8(11-12), 1939-1945.
- Dodoš, T., Rajčević, N., Janačković, P., Vujisić, L., & Marin, P. D. (2019). Essential oil profile in relation to geographic origin and plant organ of *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. *Industrial Crops and Products*, 139, 111549. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111549.
- Donay, J. L., Fernandes, P., Lagrange, P. H., & Herrmann, J. L. (2007). Evaluation of the inoculation procedure using a 0.25 McFarland standard for the BD Phoenix automated microbiology system. *Journal of clinical microbiology*, 45(12), 4088-4089.
- Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316. DOI : 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dziri, S., & Hosni, K. (2012). Effects of cement dust on volatile oil constituents and antioxidative metabolism of Aleppo pine (*Pinus halepensis*) needles. *Acta physiologiae plantarum*, 34(5), 1669-1678.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(4), 308-323.
- El Omari, N., Guaouguou, F. E., El Menyiy, N., Benali, T., Aanniz, T., Chamkhi, I., ... & Bouyahya, A. (2021). Phytochemical and biological activities of *Pinus halepensis* mill., and their ethnomedicinal use. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113661.
- Elaissi, A., Rouis, Z., Mabrouk, S., Salah, K. B. H., Aouni, M., Khouja, M. L., ... & Harzallah-Skhiri, F. (2012). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen Eucalyptus species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman arboreta (North East Tunisia). *Molecules*, 17(3), 3044-3057. DOI : 10.3390/molecules17033044.
- Elkady, W. M., Gonaïd, M. H., Yousif, M. F., El-Sayed, M., & Omar, H. A. (2021). Impact of Altitudinal Variation on the Phytochemical Profile, Anthelmintic and Antimicrobial Activity of Two *Pinus* Species. *Molecules*, 26(11), 3170.
- El-Settawy, A. E. S., Hassan, F. A., Salem, M. Z., & Soliman, M. A. (2016). Chemical Composition of Essential Oils Extracted from Aleppo Pine (*Pinus halepensis* Miller) and Their Termiticidal and Fungicidal Effects. *Alexandria Journal of Agricultural Sciences*, 61(3).
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., ... & Eloutassi, N. (2019). Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. *The Scientific World Journal*, 2019.
- Eryilmaz, M., Tosun, A., & Tümen, İ. (2016). Antimicrobial activity of some species from Pinaceae and Cupressaceae. *Turk J Pharm Sci*, 13(1), 35-40.
- Euro + Med PlantBase—The Information Resource for Euro-Mediterranean Plant Diversity. Available online: <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> (accessed on 12 February 2019).
- Faleiro M. L., Miguel M. G., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito J. C. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35–40.
- Farjon, A. (1990). *Pinaceae. Drawings and descriptions of the genera Abies, Cedrus, Pseudolarix, Keteleeria, Nothotsuga, Tsuga, Cathaya, Pseudotsuga, Larix and Picea*. Koeltz scientific books.
- Fauchère, J. L., & Avril, J. L. (2002). *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses.
- Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., ... & Costa, J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian pacific journal of tropical disease*, 4(2), 97-103.
- Ferchichi, L., Chohra, D., Mellouk, K., Alsheikh, S. M., Cakmak, Y. S., & Zengin, G. (2021). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from the aerial parts of *Clematis cirrhosa* L.(Ranunculaceae) growing in Algeria. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(7), 1314-1324.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fernandez, C., Monnier, Y., Ormeño, E., Baldy, V., Greff, S., Pasqualini, V., ... & Bousquet-Mélou, A. (2009). Variations in allelochemical composition of leachates of different organs and maturity stages of *Pinus halepensis*. *Journal of chemical ecology*, 35(8), 970-979.
- Fernandez, X., Chemat, F., & Do, T. (2014). *Les huiles essentielles: Vertus et applications*. Vuibert.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226.
- Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M., & Ochocka, J. R. (2003). Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytotherapy Research*, 17(3), 227-231. DOI : 10.1002/ptr.1110.
- Fkiri, S., Rzigui, T., Elkhorchani, A., Hassine, A. B., Khaldi, A., Khouja, M. L., & Nasr, Z. (2020). Tree growth and leaf gas exchange variability of three Mediterranean *Pinus* spp. growing in a common garden in Northeastern Tunisia. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 5(1), 1-9. DOI: 10.1007/s41207-019-0136-7.
- Gad, H., Al-Sayed, E., & Ayoub, I. (2021). Phytochemical discrimination of *Pinus* species based on GC-MS and ATR-IR analyses and their impact on *Helicobacter pylori*. *Phytochemical Analysis*, 32(5), 820-835.
- Gallis, C., & Spyroglou, G. (2012). Productivity linear regression models of tree-length harvesting system in natural coastal Aleppo Pine (*Pinus halepensis* L.) Forests in the Chalkidiki area of Greece. *Croatian Journal of Forest Engineering: Journal for Theory and Application of Forestry Engineering*, 33(1), 115-123.
- Garnero, J. Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, 1996, K345 v1.
- Gavahian, M., Farahnaky, A., Javidnia, K., & Majzoobi, M. (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 85-91. DOI : 10.1016/j.ifset.2012.01.002.
- Gernandt, D. S., López, G. G., García, S. O., & Liston, A. (2005). Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon*, 54(1), 29-42.
- Ghanmi, M., Satrani, B., Chaouch, A., Aafi, A., Abid, A. E., Ismaili, M. R., & Farah, A. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'essence de térébenthine du pin maritime (*Pinus pinaster*) et du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 154(2), 293-300.
- Gómez, A., Alía, R., & Bueno, M. A. (2001). Genetic diversity of *Pinus halepensis* Mill. populations detected by RAPD loci. *Annals of Forest Science*, 58(8), 869-875. DOI : 10.1051/forest:2001170.
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13), 2471.
- Guit, B., Nedjimi, B., Guibal, F., & Chakali, G. (2015). Dendroécologie du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en fonction des paramètres stationnels dans le massif forestier de Senalba (Djelfa, Algérie). *Revue d'Ecologie, Terre et Vie*, 70(1), 32-43.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Habtemariam, S. (2019). *Introduction to plant secondary metabolites—From biosynthesis to chemistry and antidiabetic action. Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases*, 109–132. doi:10.1016/b978-0-08-102922-0.00006-7 10.1016/B978-0-08-102922-0.00006-7.
- Hajdari, A., Mustafa, B., Ahmeti, G., Pulaj, B., Lukas, B., Ibraliu, A., ... & Novak, J. (2015). Essential oil composition variability among natural populations of *Pinus mugo* Turra in Kosovo. *SpringerPlus*, 4(1), 1-13.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Ham, Y., Yang, J., Choi, W. S., Ahn, B. J., & Park, M. J. (2020). Antibacterial activity of essential oils from Pinaceae leaves against Fish pathogens. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*, 48(4), 527-547.
- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- Hamrouni, L., Hanana, M., Amri, I., Romane, A. E., Gargouri, S., & Jamoussi, B. (2015). Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities. *Archives of phytopathology and plant protection*, 48(2), 145-158.
- Hajdari, A., Mustafa, B., Ahmeti, G., Pulaj, B., Lukas, B., Ibraliu, A., ... & Novak, J. (2015). Essential oil composition variability among natural populations of *Pinus mugo* Turra in Kosovo. *SpringerPlus*, 4, 1-13.
- Hanif, M. A., Nisar, S., Khan, G. S., Mushtaq, Z., & Zubair, M. (2019). Essential oils. In *Essential oil research* (pp. 3-17). Springer, Cham.
- Hendawy, S. F., El Gendy, A. G., Omer, E. A., Pistelli, L., & Pistelli, L. (2018). *Growth, Yield and Chemical Composition of Essential Oil of Mentha piperita var. multimentha Grown Under Different Agro-ecological Locations in Egypt. Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(1), 23–39. doi:10.1080/0972060x.2017.1423247
- Hmamouchi, M., Hamamouchi, J., Zouhdi, M., & Bessiere, J. M. (2001). Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan Pinaceae. *Journal of Essential Oil Research*, 13(4), 298-302. DOI:10.1080/10412905.2001.9699699
- Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z., ... & Geissler, M. (2009). Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 21(5), 459-463.
- Hou, T., Sana, S. S., Li, H., Xing, Y., Nanda, A., Netala, V. R., & Zhang, Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*, 101716.
- Huang, K., Liu, R., Zhang, Y., & Guan, X. (2021). Characteristics of two cedarwood essential oil emulsions and their antioxidant and antibacterial activities. *Food chemistry*, 346, 128970.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1827-1836.
- Ioannou, E., Koutsaviti, A., Tzakou, O., & Roussis, V. (2014). The genus *Pinus*: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species. *Phytochemistry*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Reviews*, 13(4), 741-768.
- Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., ... & Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and chemical toxicology*, 121, 82-94.
- James, A. T., Martin, A. J. P., & Smith, G. H. (1952). Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of ammonia and the methylamines. *Biochemical Journal*, 52(2), 238.
- Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., & Sotomayor, J. A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food control*, 30(2), 463-468.
- Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A., & Sotomayor, J. A. (2006). Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial crops and products*, 24(3), 253-263.
- Joulain, D., & König, W. A. (1998). *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. EB-Verlag.
- Kadik, B. (1987). Contribution à l'étude du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie: écologie, dendrométrie, morphologie (Doctoral dissertation).
- Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., & Montero, J. L. (2014). Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial crops and products*, 54, 6-12. DOI : 10.1016/j.indcrop.2013.12.051.
- Kadri, N., Khettal, B., Adjebli, A., Cresteil, T., Yahiaoui-Zaidi, R., Barragan-Montero, V., & Montero, J. L. (2014). Antiangiogenic activity of neutral lipids, glycolipids, and phospholipids fractions of *Pinus halepensis* Mill. seeds. *Industrial crops and products*, 54, 6-12. DOI : 10.1016/j.indcrop.2013.12.051.
- Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829. DOI : 10.2174/0929867033457719.
- Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles: qualité et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Springer.
- Kamiie, Y., Sagisaka, M., & Nagaki, M. (2014). Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* "Hidcote": Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction methods. *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 39(4), 485-489.
- Karapandzova, M., Stefkov, G., Dokic, E. T., Kaftandzieva, A., & Kulevanova, S. (2012). Antimicrobial activity of needle essential oil of *Pinus peuce* Griseb.(Pinaceae) from Macedonian flora. *Macedonian pharmaceutical bulletin*.
- Karousou, R., Koureas, D. N., & Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66(22), 2668-2673.
- Kasali, A. A., Eshilokun, A. O., Adeola, S., Winterhalter, P., Knapp, H., Bonnländer, B., & Koenig, W. A. (2005). Volatile oil composition of new chemotype of *Ocimum basilicum* L. from Nigeria. *Flavour and fragrance journal*, 20(1), 45-47. DOI: 10.1002/ffj.1361
- Kaundun, S. S., & Lebreton, P. (2010). Taxonomy and systematics of the genus *Pinus* based on

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- morphological, biogeographical and biochemical characters. *Plant Systematics and Evolution*, 284(1), 1-15.
- Khare, S., Singh, N. B., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V., ... & Amist, N. (2020). Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology*, 63(3), 203-216.
- Khaw, K. Y., Parat, M. O., Shaw, P. N., & Falconer, J. R. (2017). Solvent supercritical fluid technologies to extract bioactive compounds from natural sources: A review. *Molecules*, 22(7), 1186. DOI : 10.3390/molecules22071186.
- Khodaei, N., Nguyen, M. M., Mdimagh, A., Bayen, S., & Karboune, S. (2021). Compositional diversity and antioxidant properties of essential oils: Predictive models. *LWT*, 138, 110684.
- Khouja, M., Alves, R. C., Melo, D., Costa, A. S., Nunes, M. A., Khaldi, A., ... & Messaoud, C. (2021). Morphological and Chemical Differentiation between Tunisian Populations of *Pinus halepensis*, *Pinus brutia*, and *Pinus pinaster*. *Chemistry & Biodiversity*, 18(6), e2100071. DOI: 10.1002/cbdv.202100071 .
- Khouja, M., Elaissi, A., Ghazghazi, H., Boussaid, M., Khouja, M. L., Khaldi, A., & Messaoud, C. (2020). Variation of essential oil composition, antioxidant and anticholinesterase activities between *Pinus halepensis* Mill. plant organs. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(6), 1450-1462.
- Kopacznyk, J. M., Warguła, J., & Jelonek, T. (2020). The variability of terpenes in conifers under developmental and environmental stimuli. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104197.
- Kotroni, E., Simirioti, E., Kikionis, S., Sfiniadakis, I., Siamidi, A., Karalis, V., ... & Rallis, M. (2019). In vivo evaluation of the anti-inflammatory activity of electrospun micro/nanofibrous patches loaded with *Pinus halepensis* bark extract on hairless mice skin. *Materials*, 12(16), 2596.
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*, 25(18), 4125.
- Ksouda, G., Sellimi, S., Merlier, F., Falcimaigne-Cordin, A., Thomasset, B., Nasri, M., & Hajji, M. (2019). Composition, antibacterial and antioxidant activities of *Pimpinella saxifraga* essential oil and application to cheese preservation as coating additive. *Food chemistry*, 288, 47-56.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4), 633-640.
- Kunle, O., Okogun, J., Egamana, E., Emojevwe, E., & Shok, M. (2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, 10(1), 59-61. DOI: 10.1078/094471103321648674.
- Lagunez Rivera, L. (2006). *Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe* (Doctoral dissertation). <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000333/>.
- Lahlou, M. (2003). Composition and molluscicidal properties of essential oils of five Moroccan Pinaceae. *Pharmaceutical biology*, 41(3), 207-210.
- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., & Carde, J. P. (1994). Biogénèse des monoterpènes. I: Localisation et sécrétion. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*, 133(1-2), 69-78.
- Lee, Y. L., & Ding, P. (2016). Production of essential oil in plants: ontogeny, secretory structures and seasonal variations. *Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews*, 2(1).
- Li, Y. Q., Kong, D. X., & Wu, H. (2013). Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, 41, 269-278.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2014). *Essential oils as reagents in green chemistry* (Vol. 1, pp. 71-78). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Li, Z. H., Cai, M., Liu, Y. S., Sun, P. L., & Luo, S. L. (2019). Antibacterial activity and mechanisms of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules*, 24(8), 1577.
- Limam, H., Jemaa, M. B., Tamar, S., Ksibi, N., Khammassi, S., Jallouli, S., ... & Msaada, K. (2020). Variation in chemical profile of leaves essential oils from thirteen Tunisian Eucalyptus species and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. *Industrial Crops and Products*, 158, 112964. DOI : 10.1016/j.indcrop.2020.112964.
- Liu, Z., Fan, W., & Xie, Q. (2022). Chemical Composition, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of the Essential Oils Extracted from the Needle of Ten *Pinus Taxa*. *Journal of Chemistry*, 2022.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132.
- Macchia, A., Aureli, H., Prestileo, F., Ortenzi, F., Sellathurai, S., Docci, A., ... & La Russa, M. F. (2022). In-Situ Comparative Study of Eucalyptus, Basil, Cloves, Thyme, Pine Tree, and Tea Tree Essential Oil Biocide Efficacy. *Methods and Protocols*, 5(3), 37.
- Macchioni, F., Cioni, P. L., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S., & Ansaldi, M. (2003). Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2), 139-143. DOI: 10.1002/ffj.1178.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Silva, A. S., Nabavi, S. F., Tsetegho Sokeng, A. J., ... & Nabavi, S. M. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. *Materials*, 10(8), 947. DOI : 10.3390/ma10080947.
- Marino M., Bersani C., Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187–195.
- Marouf, A., & Tremblin, G. (2016). *Abrégé de biochimie appliquée*. EDP sciences.
- Marto, J., Gouveia, L. F., Gonçalves, L., Chiari-Andréo, B. G., Isaac, V., Pinto, P., ... & Ribeiro, H. M. (2016). Design of novel starch-based Pickering emulsions as platforms for skin photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 56-64.
- Mehalaine, S., & Chenchouni, H. (2021). Quantifying how climatic factors influence essential oil yield in wild-growing plants. *Arabian Journal of Geosciences*, 14(13), 1-12.
- Meziti, H., Bouriche, H., Kada, S., Demirtas, I., Kizil, M., Senator, A., & Garrido, G. (2019). Phytochemical analysis, and antioxidant, anti-hemolytic and genoprotective effects

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- of *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. methanolic extracts. *J. Pharm. Pharmacogn. Res*, 7, 260-272.
- Miara, M. D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M. A., & Maggi, F. (2019). Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, 16, 100262. DOI : 10.1016/j.hermed.2019.100262.
- Miladinović, D. L., Dimitrijević, M. V., Mihajilov-Krstev, T. M., Marković, M. S., & Ćirić, V. M. (2021). The significance of minor components on the antibacterial activity of essential oil via chemometrics. *LWT*, 136, 110305. DOI : 10.1016/j.lwt.2020.110305.
- Millet, F. (2010). Les formes galéniques et les huiles essentielles. *Phytothérapie*, 8(1), 33-36.
- Millet, F. (2013). *Le grand guide des huiles essentielles*. Marabout.
- Minervini, F., Missaoui, J., Celano, G., Calasso, M., Achour, L., Saidane, D., ... & De Angelis, M. (2019). Use of autochthonous Lactobacilli to increase the safety of Zgougou. *Microorganisms*, 8(1), 29.
- Mitić, Z. S., Jovanović, B., Jovanović, S. Č., Mihajilov-Krstev, T., Stojanović-Radić, Z. Z., Cvetković, V. J., ... & Stojanović, G. S. (2018). Comparative study of the essential oils of four *Pinus* species: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 111, 55-62.
- Mitić, Z. S., Jovanović, B., Jovanović, S. Č., Stojanović-Radić, Z. Z., Mihajilov-Krstev, T., Jovanović, N. M., ... & Stojanović, G. S. (2019). Essential oils of *Pinus halepensis* and *P. heldreichii*: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial crops and products*, 140, 111702. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111702.
- Mitić, Z. S., Stojanović-Radić, Z., Cvetković, V. J., Jovanović, S. Č., Dimitrijević, M., Ickovski, J. D., ... & Stojanović, G. S. (2021). *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae): volatile profiles, antimicrobial activity and toxicological evaluation of its essential oil. *Chemistry & Biodiversity*, 18(9), e2100424.
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. In *Soft chemistry and food fermentation* (pp. 379-419). Academic Press.
- Moghaddam, M., Miran, S. N. K., Pirbalouti, A. G., Mehdizadeh, L., & Ghaderi, Y. (2015). Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) fruits during stages of maturity. *Industrial Crops and Products*, 70, 163-169.
- Mohamadi, N., & Rajaei, P. (2016). Effects of different ecological condition on the quality and quantity of essential oils of *Artemisia persica* Boiss. Populations from Kerman, Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(1), 200-207.
- Mohamed, A. A., Behiry, S. I., Ali, H. M., EL-Hefny, M., Salem, M. Z., & Ashmawy, N. A. (2020). Phytochemical compounds of branches from *P. halepensis* oily liquid extract and *S. terebinthifolius* essential oil and their potential antifungal activity. *Processes*, 8(3), 330.
- Mohamed, A. A., Behiry, S. I., Ali, H. M., EL-Hefny, M., Salem, M. Z., & Ashmawy, N. A. (2020). Phytochemical compounds of branches from *P. halepensis* oily liquid extract and *S. terebinthifolius* essential oil and their potential antifungal activity. *Processes*, 8(3), 330.
- Mohareb, A. S., Kherallah, I. E., Badawy, M. E., Salem, M. Z., & Yousef, H. A. (2017).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chemical composition and activity of bark and leaf extracts of *Pinus halepensis* and *Olea europaea* grown in AL-Jabel AL-Akhdar region, Libya against some plant phytopathogens. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng*, 3, 331-342.
- Molotkov, P. I., & Patlaj, I. N. (1991). Systematic position within the genus *Pinus* and intraspecific taxonomy. In *Developments in Plant Genetics and Breeding* (Vol. 3, pp. 31-40). Elsevier.
- Mondiale de la Santé, O. (2013). *Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023*. Organisation mondiale de la Santé.
- Motte-Florac, E. (2000). Les utilisations médicinales de la résine de Pin dans le centre du Mexique: la disparition d'un savoir. *Acta Botanica Gallica*, 147(3), 303-304. DOI : 10.1080/12538078.2000.10515858
- Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34-40. DOI : 10.1080/10412905.2013.860409
- Mutlu-Ingok, A., Devencioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., & Capanoglu, E. (2020). Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. *Molecules*, 25(20), 4711.
- Nahal, I. (1962). Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. In *Annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences* (Vol. 19, No. 4, pp. 475-686).
- Nam, A. M., Tomi, F., Gibernau, M., Casanova, J., & Bighelli, A. (2016). Composition and chemical variability of the needle oil from *Pinus halepensis* growing in Corsica. *Chemistry & Biodiversity*, 13(4), 380-386.
- Nam, A.-M., Casanova, J., Tomi, F., & Bighelli, A. (2014). *Composition and Chemical Variability of Corsican Pinus halepensis Cone Oil*. *Natural Product Communications*, 9(9), 1934578X1400900. DOI:10.1177/1934578x1400900935.
- Nazari, M., Ghanbarzadeh, B., Kafil, H. S., Zeinali, M., & Hamishehkar, H. (2019). Garlic essential oil nanophytosomes as a natural food preservative: Its application in yogurt as food model. *Colloid and interface science communications*, 30, 100176.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474. DOI : 10.3390/ph6121451.
- Nergiz, C., & Dönmez, I. (2004). Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry*, 86(3), 365-368.
- Nergiz, C., & Dönmez, I. (2004). Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry*, 86(3), 365-368. DOI : 10.1016/j.foodchem.2003.09.009.
- Nicoletti, M., Maggi, F., Papa, F., Vittori, S., Quassinti, L., Bramucci, M., ... & Rasoanaivo, P. (2012). In vitro biological activities of the essential oil from the 'resurrection plant' *Myrothamnus moschatus* (Baillon) Niedenzu endemic to Madagascar. *Natural Product Research*, 26(24), 2291-2300.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.
- Oliveira M.J., Iani F.P.C., Oliveira C.B.A., Santos M.R., Souza P.S., Santos S.C., Seraphin J.C. and Ferri P.H. (2005) – Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 275-285.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Oliveira, G. L. S. (2015). Determination in vitro of the antioxidant capacity of natural products by the DPPH• method: review study. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17(1), 36-44.
- Olszowy, M., & Dawidowicz, A. L. (2016). Essential oils as antioxidants: Their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and  $\beta$ -carotene bleaching methods. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 147(12), 2083-2091.
- Ouknin, M., Romane, A., Costa, J., & Majidi, L. (2019). Comparative study of the chemical profiling, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of different parts of *Thymus wilddenowii* Boiss & Reut. *Natural product research*, 33(16), 2398-2401.
- Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Tue Bi B., Kanko C., Boti J.B., Ahibo C. & Casanova J., 2010.- Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimumgratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Reaserch*. **1**: 50-59.
- Oyewole, K. A., Oyedara, O. O., Awojide, S. H., Olawade, M. O., & Adetunji, C. O. (2021). Chemical constituents and antibacterial activity of essential oils of needles of *Pinus sylvestris* (Scots pine) from South West Nigeria. Doi : 10.21203/rs.3.rs-635195/v1.
- Padrini, F., & Lucheron, M. T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles Guide pratique pour retrouver vitalité bien être et beauté avec les essences et l'aramassage énergétique avec plus de 100 photographies. DeVecchi. 15p.
- Padrini, F., & Lucheron, M. T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles Guide pratique pour retrouver vitalité bien être et beauté avec les essences et l'aramassage énergétique avec plus de 100 photographies. DeVecchi. 15p.
- Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Palá-Paúl, R., Sanz, J., & Conejero, F. (2001). Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical systematics and ecology*, 29(7), 663-672.
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in microbiology*, 7, 2161. DOI : 10.3389/fmicb.2016.02161.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., & Codina, C. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6882-6890.
- Pavela, R., Maggi, F., Mazzara, E., Torresi, J., Cianfaglione, K., Benelli, G., & Canale, A. (2021). Prolonged sublethal effects of essential oils from non-wood parts of nine conifers on key insect pests and vectors. *Industrial Crops and Products*, 168, 113590.
- Peng H.Y., and Yang X.E. (2005) - Volatile constituents in the flowers of *Elsholtzia argyi* and their variation: a possible utilization of plant resources after phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B (2): 91-95.
- Petri, A., Alexandratou, E., Kyriazi, M., Rallis, M., Roussis, V., & Yova, D. (2012). Combination of Fospeg-IPDT and a natural antioxidant compound prevents photosensitivity in a murine prostate cancer tumour model. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 9(2), 100-108.
- Pibiri, M. C. (2006). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles* (No. THESIS). EPFL.
- Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808-811.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Pirbalouti, A. G., Mahdad, E., & Craker, L. (2013). Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. *Food chemistry*, 141(3), 2440-2449.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 38(7), 592-607.
- Quezel, P. (1986). Les pins du groupe «Halepensis»: écologie, végétation, écophysiologie. *Options méditerranéennes*, 1, 11-23.
- Quézel, P. (2000). Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinus halepensis* and *P. brutia*). *Ecology, biogeography and management of Pinus halepensis and P. brutia forest ecosystems in the Mediterranean Basin*, 1-12.
- Quézel, P. (2000). *Réflexions sur l'évolution de la flore et de la végétation au Maghreb méditerranéen* (Vol. 1, pp. 1-10). Paris: Ibis Press.
- Quézel, P., Barbero, M., & Akman, Y. (1992). Typification de syntaxa décrits en région méditerranéenne orientale. *Ecologia mediterranea*, 18(1), 81-87.
- Quézel, P., Santa, S., & Schotter, O. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales-v. 1-2.
- Rahali, N., Mehdi, S., Younsi, F., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2017). Antioxidant,  $\alpha$ -amylase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Hertia cheirifolia* essential oils: Influence of plant organs and seasonal variation. *International journal of food properties*, 20(sup2), 1637-1651.
- Raho, G. B. (2014). Antibacterial potential of essential oils of the needles of *Pinus halepensis* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(8), 651-655.
- Ran, J. H., Shen, T. T., Wu, H., Gong, X., & Wang, X. Q. (2018). Phylogeny and evolutionary history of Pinaceae updated by transcriptomic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 129, 106-116.
- Randrianarivelo, R., Sarter, S., Odoux, E., Brat, P., Lebrun, M., Romestand, B., ... & Danthu, P. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chemistry*, 114(2), 680-684.
- Raut, J. S., & Karuppaiyl, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.05.055.
- Rehman, R., Hanif, M. A., Mushtaq, Z., & Al-Sadi, A. M. (2016). Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. *Food Reviews International*, 32(2), 117-160. DOI: 10.1080/87559129.2015.1057841.
- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 275-297.
- Rhind, J. P. (2012). *Essential oils: a handbook for aromatherapy practice* Singing Dragon.
- Rigane, G., Jebali, J., Ghazghazi, H., Riguene, H., Khouja, M. L., & Salem, R. B. (2019). Chemical composition and biological activities of *Pinus halepensis* Mill. oil. *Revue Roumaine de Chimie*, 64(11), 999-1006.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Robard, I. (2004). Plantes médicinales d'outre-mer et pharmacopées: aspects juridiques, économiques et culturels. *Phytothérapie*, 2(1), 16-21.
- Rodrigues, A. M., Mendes, M. D., Lima, A. S., Barbosa, P. M., Ascensão, L., Barroso, J. G., ... & Figueiredo, A. C. (2017). Pinus halepensis, Pinus pinaster, Pinus pinea and Pinus sylvestris essential oils chemotypes and monoterpene hydrocarbon enantiomers, before and after inoculation with the pinewood nematode Bursaphelenchus xylophilus. *Chemistry & Biodiversity*, 14(1), e1600153.
- Romanenko, E. P., Domrachev, D. V., & Tkachev, A. V. (2022). Variations in Essential oils from South Siberian conifers of the Pinaceae family: new data towards identification and quality control. *Chemistry & Biodiversity*, 19(2), e202100755.
- Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 1829-1842.
- Roussis, V., Petrakis, P. V., Ortiz, A., & Mazomenos, B. E. (1995). Volatile constituents of needles of five Pinus species grown in Greece. *Phytochemistry*, 39(2), 357-361.
- Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Delfino, S., Cardile, V., ... & Bruno, M. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (Salvia officinalis L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 42-47.
- Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadeif, Y. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de Pinus halepensis Mill. du Nord est Algérien. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 30, 33-39.
- Sahi, L. (2016). La dynamique des plantes aromatiques et médicinales en Algérie [Troisième partie].
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), 121-137.
- Sandri, I. G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A. P. L., & Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Cunila against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food chemistry*, 103(3), 823-828. DOI : 10.1016/j.foodchem.2006.09.032.
- Santonja, M., Bousquet-Mélou, A., Greff, S., Ormeño, E., & Fernandez, C. (2019). Allelopathic effects of volatile organic compounds released from Pinus halepensis needles and roots. *Ecology and evolution*, 9(14), 8201-8213.
- Šarac, Z., Matejić, J. S., Stojanović-Radić, Z. Z., Veselinović, J. B., Džamić, A. M., Bojović, S., & Marin, P. D. (2014). Biological activity of Pinus nigra terpenes—evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in biology and medicine*, 54, 72-78. DOI : 10.1016/j.compbiomed.2014.08.022.
- Schnaubelt, K. (2011). *The healing intelligence of essential oils: the science of advanced aromatherapy*. Simon and Schuster.
- Seigue, A. (1985). The circum-mediterranean forest and its problems. The circum mediterranean forest and its problems.
- Sell, C. (2020). Chemistry of essential oils. In *Handbook of Essential Oils* (pp. 161-189). CRC Press.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Semerdjieva, I., Zheljaskov, V. D., Radoukova, T., Radanović, D., Marković, T., Dincheva, I., ... & Kačániová, M. (2019). Essential oil yield, composition, bioactivity and leaf morphology of *Juniperus oxycedrus* L. from Bulgaria and Serbia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 84, 55-63. DOI : 10.1016/j.bse.2019.04.001.
- Serre, F. (1973). Contribution à l'étude dendroclimatologique du pin d'Alep. Doctorat sciences naturelles, Université Aix-Marseille III.
- Shaaban, H. A., El-Ghorab, A. H., & Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 203-212.
- Shams, M., Esfahan, S. Z., Esfahan, E. Z., Dashtaki, H. N., Dursun, A., & Yildirim, E. (2016). Effects of climatic factors on the quantity of essential oil and dry matter yield of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Indian Journal of Science and Technology*, 9(6), 1-4.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., & Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), 70. 10.3390/molecules22010070.
- Sharma, M., Koul, A., Sharma, D., Kaul, S., Swamy, M. K., & Dhar, M. K. (2019). Metabolic engineering strategies for enhancing the production of bio-active compounds from medicinal plants. In *Natural bio-active compounds* (pp. 287-316). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-7438-8\_12.
- Shellie, R. A. (2009). Volatile components of plants, essential oils, and fragrances. *Comprehensive analytical chemistry*, 55, 189-213.
- Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of biological Chemistry*, 269(11), 8022-8028. DOI : 10.1016/S0021-9258(17)37154-5.
- Simard, F. (2007). Évaluation du potentiel anticancéreux des extractibles du bois de pin rouge. Université du Québec à Chicoutimi.
- Simpson, M. G. (2019). Evolution and diversity of woody and seed plants. *Plant Systematics; Elsevier: New York, NY, USA*, 131-165.
- Singh, N.; Luthra, T.; Sangwan, R.S.; Thakur, R.S. *Curr. Res. Med. Aromat. Plants* 1990, 11, 174-196.
- Singh, S., Sahoo, B. C., Ray, A., Jena, S., Dash, M., Nayak, S., ... & Sahoo, S. (2021). Intraspecific chemical variability of essential oil of *Curcuma caesia* (Black Turmeric). *Arabian Journal for Science and Engineering*, 46(1), 191-198.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- Smallfield, B. (2001). *Introduction to Growing Herbs for Essential Oils, Medicinal and Culinary Purposes: Bruce Smallfield*. Crop & Food Research.
- Soe'eib, S., Asri, N. P., & NH, A. D. S. (2017). Enflourage Essential Oil from Jasmine and Rose Using Cold Fat Adsorbent. *Widya Teknik*, 15(1), 58-61.
- Sousa, D. P. D. (2012). *Medicinal essential oils*. Nova Science Publishers.
- Stein, S., Mirokhin, D., Tchekhovskoi, D., Mallard, G., Miksaia, A., Zaikin, V., & Sparkmann, D. (2002). The NIST mass spectral search program for the NIST/EPA/NIH mass spectra library. *Gaithersburg, MD: Standard Reference Data Program of the National Institute of Standards and Technology*.
- Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. In *Essential oils in*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- food preservation, flavor and safety* (pp. 31-38). Academic Press.
- Suárez-Vidal, E., Sampedro, L., Voltas, J., Serrano, L., Notivol, E., & Zas, R. (2019). Drought stress modifies early effective resistance and induced chemical defences of Aleppo pine against a chewing insect herbivore. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 550-559.
- Süntar, I., Tumen, I., Ustün, O., Keleş, H., & Akkol, E. K. (2012). Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by in vivo and in vitro experimental models. *Journal of ethnopharmacology*, 139(2), 533-540. DOI: 10.1016/j.jep.2011.11.045.
- Svoboda, K. P., & Hampson, J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW, 16*, 1-7.
- Svoboda, K. P., Svoboda, T. G., & Syred, A. D. (2000). *Secretory structures of aromatic and medicinal plants: a review and atlas of micrographs*. microscopix publications.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and alternative medicine*, 2016. DOI : 10.1155/2016/3012462.
- Taraj, K., Malollari, I., Ylli, F., Maliqati, R., Andoni, A., & Llupa, J. (2018). Spectroscopic study on chemical composition of essential oil and crude extract from Albanian Pinus halepensis Mill. *Journal of Agriculture Informatics*, 9(1), 41-46.
- Taraj, K., Malollari, I., Ylli, F., Maliqati, R., Andoni, A., & Llupa, J. (2018). Spectroscopic study on chemical composition of essential oil and crude extract from Albanian Pinus halepensis Mill. *Journal of Agriculture Informatics*, 9(1), 41-46. DOI: 10.17700/jai.2018.9.1.440.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., ... & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial pathogenesis*, 134, 103580.
- Tazerouti, F., Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y., Meklati, B. Y., Favre-Bonvin, J., & Bobenrieth, M. J. (1993). Analysis of essential oils from needles of *Pinus halepensis* Mill. by gas chromatography and mass spectrometry. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 26(3), 161-176.
- Thompson, J. D., Chalchat, J. C., Michet, A., Linhart, Y. B., & Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of chemical ecology*, 29(4), 859-880. DOI: 10.1023/a:1022927615442.
- Tomi, F., & Casanova, J. (2006, February). 13C NMR AS A TOOL FOR IDENTIFICATION OF INDIVIDUAL COMPONENTS OF ESSENTIAL OILS FROM LABIATAE-A REVIEW. In *I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation 723* (pp. 185-192).
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249. DOI : 10.1111/1750-3841.12492.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Tonzibo, Z. F., Koffi, A. M., Wognin, E. L., Bedi, G., & Chalchat, J. C. (2013). Intraspecific chemical variability of essential oil of *Hoslundia opposita*.
- Tozin, L. R., Marques, M. O., & Rodrigues, T. M. (2015). Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87, 943-953.
- Tumen, I., Hafizoglu, H., Kilic, A., Dönmez, I. E., Sivrikaya, H., & Reunanen, M. (2010). Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. natively grown in Turkey. *Molecules*, 15(8), 5797-5806.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1), 40-53.
- Turina, A. D. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., & Perillo, M. A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical chemistry*, 122(2), 101-113.
- Türkmen, M., Kara, M., Maral, H., & Soylu, S. (2022). Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(6), e15787.
- Ustun, O., Senol, F. S., Kurkcuoglu, M., Orhan, I. E., Kartal, M., & Baser, K. H. C. (2012). Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products*, 38, 115-123. DOI : 10.1016/j.indcrop.2012.01.016.
- Ustun, O., Sezik, E., Kurkcuoglu, M., & Baser, K. H. C. (2006). Study of the essential oil composition of *Pinus sylvestris* from Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(1), 26-31. DOI: 10.1007/s10600-006-0029-2.
- Vagi E., Simandi B., Suhajda A., Héthelyi E. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 38:51-57.
- Valnet, J. (1984). Aromathérapie: traitement de maladie par les plantes. *Maloine SA Editeur Paris*.
- Van Zyl, R. L., Seatlholo, S. T., Van Vuuren, S. F., & Viljoen, A. M. (2006). The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 18(sup1), 129-133.
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
- Vidic, D., Čavar Zeljković, S., Dizdar, M., & Maksimović, M. (2016). Essential oil composition and antioxidant activity of four Asteraceae species from Bosnia. *Journal of Essential Oil Research*, 28(5), 445-457.
- Vidrich, V., Michelozzi, M., Fusi, P., & Heimler, D. (1988). Essential oils of vegetables species of the mediterranean and alpine temperate climate areas. In *Proceedings of the 4th EC Conference, Biomass for Energy and Industry* (pp. 963-967). Elsevier Applied Science, London.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. DOI:10.1093/mp/ssp106 .
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Weidinger, A., & Kozlov, A. V. (2015). Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*, 5(2), 472-484.
- Wink, M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2(3), 251-286.
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. *Molecules*, 24(11), 2130.
- Wu, Y., Han, X., Yuan, W., Wang, X., Meng, D., Hu, J., & Lv, Z. (2020). Salt intervention for the diversities of essential oil composition, aroma and antioxidant activities of Kushui rose (*R. setata* × *R. rugosa*). *Industrial crops and products*, 150, 112417.
- Xianfei, X., Xiaoqiang, C., Shunying, Z., & Guolin, Z. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chemistry*, 100(4), 1312-1315. DOI : 10.1016/j.foodchem.2005.12.011.
- Xie, Q., Liu, Z., & Li, Z. (2015). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of six pinus taxa native to China. *Molecules*, 20(5), 9380-9392.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yang, X., Zhao, H. T., Wang, J., Meng, Q., Zhang, H., Yao, L. & Ding, Y. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of pine cones of *Pinus armandii* from the Southwest region of China. *J. Med. Plants Res*, 4(16), 1668-1672.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The open microbiology journal*, 8, 6.
- Yatagai, M., Ohira, M., Ohira, T., & Nagai, S. (1995). Seasonal variations of terpene emission from trees and influence of temperature, light and contact stimulation on terpene emission. *Chemosphere*, 30(6), 1137-1149.
- Yossa, N., Patel, J., Millner, P., Ravishankar, S., & Lo, Y. M. (2013). Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* on lettuce. *Foodborne pathogens and disease*, 10(1), 87-96.
- Yu, X., Liang, C., Fang, H., Qi, X., Li, W., & Shang, Q. (2018). Variation of trichome morphology and essential oil composition of seven *Mentha* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 79, 30-36.
- Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub H. and Gharsallah N. (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, 10:161.
- Zavala, M. A., & Zea, E. (2004). Mechanisms maintaining biodiversity in Mediterranean pine-oak forests: insights from a spatial simulation model. *Plant Ecology*, 171(1), 197-207. DOI:10.1023/B:VEGE.0000029387.15947.b7
- Zeng, W. C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L. R., & He, Q. (2012). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of essential oil from pine needle (*Cedrus deodara*). *Journal of food science*, 77(7), C824-C829. DOI : 10.1111/j.1750-3841.2012.02767.x.
- Zgurskaya, H. I., López, C. A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability barrier of Gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS infectious diseases*, 1(11), 512-522. DOI : 10.1021/acsinfecdis.5b00097.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Zhang, H. Y. (2005). Structure-activity relationships and rational design strategies for radical-scavenging antioxidants. *Current Computer-Aided Drug Design*, 1(3), 257-273.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13(1), 1-26.
- Zheljazkov, V. D., Craker, L. E., & Xing, B. (2006). Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environmental and Experimental Botany*, 58(1-3), 9-16.
- Zhiri, A., & Baudoux, D. (2005). Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. *Luxembourg: Éditions Inspir*.
- Zizovic, I., Stamenić, M., Orlović, A., & Skala, D. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale. *The journal of supercritical fluids*, 39(3), 338-346. DOI: 10.1016/j.supflu.2006.03.009.
- Zuzarte M. and Salgueiro L. (2015). Essential Oils Chemistry. In: de Sousa D.P. (ed.), *Bioactive Essential Oils and Cancer*. Springer, Switzzland, pp 19-61.

## ملخص:

خصص هذا العمل لدراسة التركيب الكيميائي و النشاط المضاد للبكتيريا و المضاد للإجهاد التأكسدي للزيوت الأساسية لنبات الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis* Mill.) المحصل عليه من 15 منطقة في الشرق الجزائري. تم استخلاص الزيوت الأساسية من الأجزاء الهوائية لنبات للصنوبر الحلبي بتقنية التقطير المائي والتي اعطت زيتاً أصفر اشفاف بمرود استخلاص بمعدل  $0.37 \pm 0.64\%$  لكل العينات المدروسة. سمح أيضا التحليل الكيميائي لتركيب الزيوت الأساسية للعينات المدروسة بواسطة تقنية كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة (GC / MS) Gas Chromatography–Mass Spectrometry، بتحديد 37 مركب بمتوسط  $99.4 \pm 0.4\%$  من إجمالي تركيب الزيوت. كانت غالبية المكونات عبارة عن مجموعة المركبات الهيدروكربونية (composés hydrocarbonés)، كما سمح لنا التحليل الاحصائي بتحديد العديد من الأصناف الكيميائية الأخرى الموجودة بكثرة في الزيوت أهمها  $\alpha$ -Pinene (16.86%  $\pm$  3.35)، Myrcene (19.14%  $\pm$  6.67)، Caryophyllene-E (29.06%  $\pm$  8.5)، Humulene (4.81%  $\pm$  1.43)، Phenylethyl 3-methyl butanoate (5.67%  $\pm$  2.47)، Sabinene و Terpinolene (3.94 %  $\pm$  1.6) من جهة أخرى اعطى التحليل الاحصائي بواسطة UPGMA لعينات الزيوت الأساسية إمكانية تجميعها في 5 مجموعات، حيث أن المجموعة الأولى (3.11%  $\pm$  1.84) تحتوي على مجموعة للزيوت الأساسية لمنطقة طارفنت (مدينة خنشلة، شرق الجزائر) و هذه المجموعة تتميز بوجود المركبات التالية: Sabinene -  $\Delta$ 3-carene - terpinolene تنقسم المجموعة الثانية الى مجموعتين، الأولى تتميز بوجود كل من  $\alpha$ -pinene ; caryophyllene-E ; myrcene في حين تضم المجموعة الأخرى المركبات التالية:  $\alpha$ -humulene ; caryophyllene-E ; myrcene. الدراسة التجريبية للنشاط البيولوجي للزيوت الأساسية أظهرت نشاط فعال ضد السلالات البكتيرية التالية: *Staphylococcus aureus* ;

*E. coli* السلاطات *Proteus mirabilis* ; *Bacillus cereus* *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella enteric spp arizonae*; *Listeria innocua* و *Pseudomonas aeruginosa* لم تتأثر بهذه الزيوت. بالإضافة الي ذلك اختبار DPPH أظهر أن الزيوت التي تم اختيارها لها فعالية مضادة للأكسدة. الكلمات المفتاحية: الصنوبر الحلبي، زيت أساسي، كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة، أصناف كيميائية، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للأكسدة.

## Résumé :

Ce travail a été consacré à l'étude de la composition chimique, l'activité antibactérienne et l'activité antioxydant des huiles essentielles de Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) obtenu de 15 localités de l'Est Algérien. Les huiles essentielles des parties aériennes de *Pinus halepensis* ont été extraites par hydro-distillation, montrant une huile transparente avec un rendement de  $0.64 \pm 0.37\%$ . En plus, ces huiles ont été analysés chimiquement par Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC / MS) et qui a permis d'identifier 37 composés avec une moyenne  $94,64\% \pm 4,87$  des huiles. La majorité des composants étaient de groupe des composés hydrocarbonés, notons aussi que l'analyse statistique a montré l'existence de chémotypes abondants dans les huiles ; caryophyllene-E (29.06%  $\pm$  8.5), myrcene (19.14%  $\pm$  6.67),  $\alpha$ -pinene (16.86%  $\pm$  3.35), phenylethyl 3-methyl butanoate (5.67%  $\pm$  2.47), -humulene (4.81%  $\pm$  1.43), terpinolene (3.94 %  $\pm$  1.6) et sabinene (3.11%  $\pm$  1.84). Par ailleurs, les échantillons des huiles essentielles ont été classés en 5 groupes en utilisant l'analyse de l'UPGMA. Le premier groupe contient l'ensemble des huiles essentielles de Tafrent (Provenance de Ouled yaakoub de Khanechela, Est Algérie) qui se caractérise par le chémotype à : Sabinene -  $\Delta$ 3-carene - terpinolene. Cependant, le deuxième groupe subdivise en deux autres groupes ; le premier chémotype contient myrcene,  $\alpha$ -pinene et caryophyllene-E, et le deuxième contient le caryophyllene-E,  $\alpha$ -humulene et myrcene. L'étude expérimentale de l'activité biologique des huiles essentielles a montré une activité antibactérienne efficace contre les souches bactériennes ; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella enteric spp arizonae*; *Listeria innocua*; *Proteus mirabilis* and *Bacillus cereus*, sauf pour *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* qui n'ont pas influencé par ces huiles. Aussi, le test DPPH a montré que les huiles sélectionnées ont une activité antioxydant efficace.

**Mots clés :** *Pinus halepensis*, Huile essentielle, CG-SM, chémotypes, activité, antimicrobienne, activité antioxydant.

## Abstract:

This work was devoted to evaluate the chemical composition and the antibacterial and antioxidant activities of essential oils of Aleppo pines (*Pinus halepensis*) from 15 localities of Eastern Algeria. The essential oils of the aerial parts of *Pinus halepensis* were extracted by hydro-distillation method, showing a viscous oil with a yield of  $0.64 \pm 0.37\%$ . In addition, these oils were chemically analysed by GC-MS method which led to identify 37 compounds at a mean oil of  $99.4 \pm 0.5$ . The major compounds were hydrocarbon compounds, as well as the statistical analysis showed the existence of other abundant chemotypes in the oils, including caryophyllene-E (29.06  $\pm$  8.5%), myrcene (19.14  $\pm$  6.67%),  $\alpha$ -pinene (16.86  $\pm$  3.35%), phenyl ethyl 3-methyl butanoate (5.67  $\pm$  2.47%), -humulene (4.81  $\pm$  1.43%), terpinolene (3.94  $\pm$  1.6%) and sabinene (3.11  $\pm$  1.84%). Further, the essential oil samples were clustered into five groups by UPGMA analysis. The first group includes the Tafrent (Mila city, East Algeria) essential oil population. It is characterized by the phenyl ethyl-3-methyl butanoate - Sabinene -  $\Delta$ 3-carene chemotype, since the second group was subdivided into two clusters; cluster including myrcene -  $\alpha$ -pinene - caryophyllene-E, and cluster including caryophyllene-E -  $\alpha$ -humulene - myrcene. The experimental study of the biological activity of essential oils showed an efficient antibacterial activity against the strains: *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella enteric spp arizonae*; *Listeria innocua*; *Proteus mirabilis* and *Bacillus cereus*, excluding *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* which have not affected by these oils. Also, the DPPH test revealed an efficient antioxidant activity of the selected oils.

Key words: *Pinus halepensis*, Essential oil, CG-SM, chemotypes, antibacterial activity, antioxidant activity