

Ü ÊÔÃ ¾ ÜÈ ÃÛ

Université Badji Mokhtar – Annaba  
Badji Mokhtar – Annaba  
University



YËØ Ì¾ÄÜ¾  
- ÄÄÜ -

Faculté des Sciences  
Département de Biologie

MEMOIRE

*Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MAGISTER*

Thème :

Etude et caractérisation chimique des huiles essentielles du genre Pinus, dans le Parc National d'El Kala (P.N.E.K.).

Option :

Physiologie des Plantes Médicinales

Présenté Par

SAADOU Nina

Directrice de mémoire : Pr. SERIDI R.

U. Annaba

Devant le jury :

Président :

Pr. TAHAR A.

U. Annaba

Examineurs :

Dr BORDJIBA O.

U. Annaba

Pr LEGSEIR B.

U. Annaba

Année: 2007- 2008

# Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier vivement tous ceux qui, grâce à leur aide précieuse, ont permis la réalisation de ce travail.

Je remercie particulièrement, Madame Seridi R. Professeur à l'université d'Annaba, pour avoir dirigé ce mémoire. Ses compétences et sa rigueur scientifique, ainsi que son appui et ses conseils, m'ont permis de mener à bien mon travail. Je lui adresse mes vifs remerciements et toute ma reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur Tahar A., Directeur du Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury.

Je remercie également Mme Bordjiba O., Maître de Conférences à l'université d'Annaba pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur Leigseir B., Professeur à l'université d'Annaba, pour avoir accepté d'examiner ce travail, ainsi que pour ses précieux conseils.

Que Monsieur Djahoudi A., Maître de Conférences à la Faculté de médecine, Université d'Annaba, trouve ici, l'expression de mon profond respect, pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire de Microbiologie et pour m'avoir initié aux techniques de microbiologie.

Je remercie également :

Monsieur DJourourou, Directeur du Laboratoire de Biocatalyse à l'Université d'Annaba ainsi que Monsieur Halaima F. et Mademoiselle Aïcha qui m'ont aidée sans commune mesure lors des analyses par CG/S

Monsieur Laredj H., Maître Assistant au Département de Pharmacie, pour sa contribution scientifique qui m'a été d'une grande utilité. J'en suis reconnaissante.

Monsieur Hadeh Y., Maître Assistant au Département de Pharmacie pour son aide efficace et son grand appui dans le traitement des données CPG/SM.

Monsieur Djillani W., Maître de Conférences à l'université d'Annaba pour ses conseils précieux dans les analyses phytochimiques préliminaires.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Madame Bouzeraa M. et Monsieur Zaafour M., Chargés de Cours, à l'université d'Annaba Pour leurs connaissances et leur aide en botanique.

Je remercie vivement Monsieur Rahmani M., Pharmacien en Chimie, pour avoir bien voulu envoyer mes échantillons pour analyse à Marseille.

Je remercie Melle djeddi S. Chargés de Cours, à l'université d'Annaba Pour ses orientations.merci

Je ne saurai oublier de remercier l'équipe, en particulier SAMIA, ingénieur de notre laboratoire «Plantes Médicinales» pour leur sympathie.

Sans les encouragements de ma mère qui m'a insufflée la volonté, ce travail n'aurait jamais vu le jour. Je remercie ma mère ainsi que mon mari et ma belle famille pour leur patience et leur soutien.

# Résumé

Une enquête ethnobotanique effectuée dans la wilaya d'Annaba et El Taref sur 100 personnes, indique la connaissance de l'usage thérapeutique important de deux espèces, *Pinus maritima* et *Pinus halepensis* Mill, dans le traitement de bronchites, inflammations de l'estomac, rhumatismes.

La large utilisation en médecine traditionnelle du genre *Pinus*, nous a incité à réaliser une analyse phytochimique préliminaire sur les feuilles des principales classes du métabolisme secondaires, à savoir, terpènes et stérols, saponines, alcaloïdes, cardénolides, tanins, et flavonoïdes.

L'huile essentielle des aiguilles de *Pinus maritima* cueillies dans deux régions différentes, les forêts Hadada et Tonga dans le P.N.E.K., a été obtenue par hydrodistillation. Le rendement est respectivement de 0,27% et 0,18%.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) nous a permis l'identification de 07 composés, dans l'HE des aiguilles de *Pinus maritima* de Hadada, dont 3 sont majoritaires:  $\alpha$ -pinène (40,31%),  $\beta$ -caryophyllène (28,54%), et caryophyllène oxide (13,42%). Au niveau de Tonga, parmi les 16 composés identifiés, les majoritaires (03) sont représentés par  $\beta$ -caryophyllène (35,99%),  $\alpha$ -pinène (20,63%),  $\alpha$ -bulnesene (15,93%) et abietatriene (8,17%).

L'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill, récoltées dans la forêt de l'Embouchure du lac Mellah (PNEK) et la forêt de Zarouria (Souk Ahras) a été également obtenue par hydrodistillation. Le rendement est respectivement 0,81%, 0,3%.

L'HE de l'Embouchure comprend 18 constituants, les majoritaires étant, le  $\beta$ -caryophyllène (31,892%), le  $\alpha$ -pinène (24,41%) et le  $\beta$ -carène (19,384%). Alors que ceux de Zarouria, au nombre de 14, sont représentés essentiellement par l' $\alpha$ -pinène (21,79%), l'Aromadendrène (32, %) et le  $\beta$ -myrcène (9,65 %).

L'activité biologique de ces HE (brutes et diluées) étudiée sur les souches : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli* a montré un pouvoir antibactérien faible.

Mots clés : huiles essentielles, *Pinus maritima* et *halepensis*, CG/SM, activité antibactérienne





# Abstract

A ethnobotanic investigation carried out in the wilaya of Annaba and El Taref into 100 people, indicates the knowledge of the significant therapeutic use of two species, *Pinus maritima* and *Pinus halepensis mill*, in the treatment of bronchitides, ignitions of the stomach, rheumatisms.

The wide use in traditional medicine led us to study this plant, leaf were screened for the principal classes of secondary metabolites, such as terpenes et serols, saponins, alcaloïds, cardénolids, tannins, et flavonoïds.

The essential oil of the needles of *Pinus maritima* gathered in two different areas, the Hadada forests and Tonga in the P.N.E.K., was obtained by hydrodistillation. The yield is respectively 0.27% and 0.18%.

The analysis by gas chromatography coupled with the mass spectrometry (CPG/SM) allowed us the identification of 07 composed, in the HE of the needles of *Pinus maritima* of Hadada, of which 3 are in a majority:  $\alpha$ - pinene (40,31%),  $\beta$ - caryophyllene (28,54%), and caryophyllene oxide (13,42%). On the level of Tonga, among the 16 made up ones identified, the majority ones (03) are represented by  $\beta$ - caryophyllene (35,99%),  $\alpha$  pinene (20,63%),  $\beta$  - bulnesene (15,93%) and abietatriene (8,17%)

The essential oil of the needles of *Pinus halepensis mill*, collected in the forest of the Mouth of the lake Mellah (PNEK) and the forest of Zarouria (Souk Ahras) was also obtained by hydrodistillation. The yield is respectively 0.81%, 0.3%.

The HE of Embouchre includes/understands 18 components, the majority ones being, *the acaryophyllene* (31,892%), *the  $\beta$  pinene* (24,41%) and  *$\beta$ - careens* (19,384%). Whereas those of Zarouria, 14, are represented primarily by the  $\alpha$  - pinene (21,79%), Aromadendrène (32, %) et *the  $\beta$  myrcene* (9,65 %).

The biological activity of these HE (rough and diluted) studied on the stocks: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli* showed a weak capacity antibactérien.

Keywords: Essentiels oils, *Pinus maritima* and *halepensis*, antibacterial activity, CG/SM



I.S.O.	International Standards Organisation
A.F.N.O.R.	Association des différentes Pharmacopées nationales et internationales
C.M.I	Concentration Minimal Inhibitrice
MH	Mueller – Hilton
Vit	Vitamine
P.N.E.K.	Parc National D'El KALA
O.M.S.	Organisation Mondiale de Santé
TR	Temp de rétention
HE	Huile essentielle
CCM	chromatographie couche mince
N,P, k,	Azote, phosphore, potassium

# introduction

La phytothérapie est une pratique millénaire basée sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil d'innombrables générations. Selon l'O.M.S, plus de 22 000 espèces végétales ont été inventoriées comme plantes médicinales. (Duraffourd et *al.* 1997). Leur usage a eu un déclin avec le développement de la chimie de synthèse, toute fois, les effets indésirables des médicaments a ravivé l'intérêt des scientifiques pour les plantes médicinales. C'est ainsi que de nouvelles recherches ont vu le jour, notamment dans l'espoir de traiter certaines maladies infectieuses par les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques, ce qui est de plus en plus fondé, du fait de l'apparition de résistances des germes aux antibiotiques.

C'est ce qui nous a incité à faire une étude sur le genre *Pinus*, Arbre largement connu pour ses vertus en phytothérapie et aromathérapie.

Dans notre travail nous avons suivi le plan suivant :

1. Une étude bibliographique qui rassemble des données sur notre thème
2. Une étude expérimentale à travers laquelle nous avons réalisé une enquête ethnobotanique afin de connaître l'utilisation populaire du pin dans le domaine de la phytothérapie traditionnelle.
3. Après un screening phytochimique des feuilles, nous avons entrepris l'analyse quantitative et qualitative de la composition chimique de l'huile essentielle de deux espèces du genres *Pinus* à (*Pinus halepensis mill et Pinus maritima* ).
4. Nous avons enfin tenté de tester le pouvoir antiseptique de ces huiles essentielles sur des germes pathogènes.

## Historique

L'usage thérapeutique des plantes remonte aux temps les plus reculés de l'histoire de l'homme .en fait, l'histoire officielle de la phytothérapie prend racine il ya plusieurs millénaires .En voici les grandes étapes.

- 5 000.00 ans avant J.-C. : premières traces d'utilisation des plantes médicinales, gravées en caractère cunéiforme sur des tablettes d'argile découvertes qui datent de l'époque sumérienne de Mésopotamie. Ce qui démontre l'importance que tenait déjà la phytothérapie à cette époque lointaine. (Wichtl, 2003)
- 1 500 ans avant J.-C.: Le fameux papyrus d'Ebers des civilisations pharaoniques, et le premier recueil consacré aux plantes médicinales, proposant un inventaire de 12 plantes accompagné avec leurs modes d'utilisation, parmi ces plantes répertoriées, on trouve le Myrrhe, le ricin, l'ail. (Iserin, 1997)
- 4 60-337 ans avant J.-C. : Hippocrate, le très célèbre médecin grec est considéré comme le père de la médecine. Son enseignement était conçu d'après la théorie des humeurs et il fut le premier à mentionner des observations cliniques avec plus de 230 plantes médicinales. . (Wichtl, 2003)
- Au cours du 1<sup>er</sup> siècle de notre ère : Dioscorides, herboriste grec, est l'auteur du premier herbier rédigé en Europe, cet ouvrage connu sous le nom De Materia Medica qui recense environs 600 plantes médicinales. Il restera l'ouvrage de référence en matière de plantes de très nombreux siècles. . (Iserin, 1997)
- Au cours du 2<sup>ème</sup> siècle : C'est au tour de Galien, encore un médecin, personnel de l'empereur romain Marc Aurèle, élaborer sa théorie propre des « Quatre Humeurs » .il est considéré comme le père de la pharmacie. (Wichtl, 2003)
  - Du 2<sup>ème</sup> AU 18<sup>ème</sup> siècle :

Le commerce entre l'Europe, le Moyen Orient, l'Inde et l'Asie commence à se développer et les routes commerciales livrent déjà les premières épices.

Bien entendu toutes les grandes civilisations ont eut leurs traditions phytothérapeutiques.

-L'épanouissement de la culture arabe à favorisé la préservation et le développement des acquis de la culture grecque puis romaine .La diffusion de la culture islamique en Afrique du Nord et dans la partie occidentale au bassin méditerranéen a permis l'éclosion d'écoles de médecine notamment à Cordoue ,en Espagne .(Iserin, 1997)

D'excellents médecins, pharmaciens, les arabes furent à l'origine de découvertes importantes : Ibn Al-Baytar un grand naturaliste et spécialiste de la matière médicale, surnommé En-Nabati. Il habita quelque temps à Séville puis il part pour l'Orient, via le Maghreb. Son voyage le mènera en Egypte, en Palestine, au Liban, en Syrie, en Irak au Hedjaz. A chacune de ces étapes Ibn Al-Baytar parle des plantes qu'il rencontre du moins celles qui sont nouvelles pour lui et devient le meilleur connaisseur de la flore du bassin méditerranéen.

Au terme de son voyage il séjourne en Egypte et rédige deux plus importants ouvrages le *FAMI EL-MUFRADAT* « le traité des simples » et le *MOGNI* qui est un traité de thérapeutique.

Dans le *Fami-el mufradat* mentionne 1400 espèces y sont traitées dont environ 300 drogues nouvelles comprennent 200 plantes. Chaque plante est étudiée suivant le plan ci-après : synonymie, description, propriétés et usages (Bellakhdar, 1997).

- Paracelse, au XVI<sup>ème</sup> siècle émit l'idée, qui est appliquée de nos jours, extraire des plantes la quintessence, c'est-à-dire les principes actifs. Mais il contribue aussi à la propagation de la théorie mystique des signatures, l'antique théorie qui prétendait que l'apparence d'une plante signalait l'affection qu'elle traitait par exemple la tête du pavot par sa forme, doit avoir une action sur la tête de l'homme. Ces singulières idées eurent cours jusqu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle (Beloued, 2005).

- Au XIX<sup>ème</sup> siècle :  
La découverte des molécules originales qui font de la valeur thérapeutique des drogues héroïques a été impressionnante.

Des progrès immenses ont été réalisés à cette époque par des pharmaciens et des chimistes qui ont ausculté nombre de plantes. Ainsi que les secrets des remèdes d'autre fois commençaient à être découverts exemple :

La morphine du pavot fut isolée en 1817 par F.N. Sertürner, la codéine par P. Robiquet en 1832 (il isola aussi l'asparagine de l'asperge) et la papavérine par Merck en 1848. C'est aussi l'époque d'isolement de l'inuline de l'inule aillée (*Inula helinium*) en 1804 et l'acide salicylique un précurseur chimique de l'aspirine est extrait du saule blanc (*Salix alba*) en 1838 et le commencement d'une longue série exemple la quinine, la strychnine et la colchicine. C'est aussi l'époque de découverte de toute une série d'alcaloïdes (atropine, éserine, cocaïne,...) (Wichtl, 2003).

En 1860 l'acide salicylique est synthétisé au laboratoire pour la première fois. Dès lors, les chimistes réussissent à déterminer comment les substances chimiques extraites des plantes agissent sur l'organisme et à comprendre le fonctionnement du corps (Iserin, 1997).

- De 1930 à nos jours :

Dans les années 1930 les médecins et les pharmaciens prescrivaient ou vendaient environ 90% de produits à base de plantes, ce n'est qu'au cours des cinquante dernières années que les médicaments conçus en laboratoire se sont imposés.

Le développement des médicaments chimiques qui permettent dans la plupart des cas une guérison rapide, l'opinion publique est convaincu que la phytothérapie est illusoire et démodée. Progressivement la prescription des médicaments chimiques prend le pas sur les remèdes à base de plantes. Simultanément les pays en voies de développement abandonnent les soins par les plantes pour adopter ceux que propose la médecine occidentale.

Au fil des années, l'opinion publique a évolué et la phytothérapie connaît un regain d'intérêt. En fait, certaines préparations à base de plantes sont maintenant si couramment utilisées. L'essence de menthe poivrée est recommandée pour les problèmes de gorge ou de transit intestinal.

Plus les hommes s'aperçoivent que leur existence est étroitement liée au destin de la planète, plus leur intérêt pour la phytothérapie croît. L'usage des plantes pour se soigner revêt ainsi une valeur écologique, car il s'agit de respecter et de protéger notre environnement naturel (Iserin, 1997).

1-1- Situation géographique du P.N.E.K

Le Parc National d'El-Kala délimite un territoire entièrement contenu dans la wilaya d'El-Tarf.

Localisée à l'extrême nord-est algérien, il est limité à l'Est par la frontière Algéro-Tunisienne, au Nord par la mer Méditerranée, à l'Ouest par l'extrémité de la plaine alluviale d'Annaba et enfin au sud par les contreforts des monts de la Medjerda. (Voir figure<sup>1</sup> 9)

Ses coordonnées géographiques sont 36°52 latitude Nord et 8°27 longitude, au niveau de la ville d'El-Kala.



Figure 1 9 : Situation géographique du P.N.E.K.

## 1-2- Géologie

Sur le plan stratigraphique, la région présente trois étages différents : le Secondaire, le Tertiaire et le Quaternaire.

### 1-2-1- Le secondaire

Cet étage est caractérisé par des formations schisteuses plus ou moins argileuses de couleur bleue ardoise avec des passages calcaireux et une microfaune d'âge Senonien supérieur. Ces formations affleurent en plusieurs endroits surtout dans la forêt de Djebel Ghorra (Menzel beldi), sur la rive Ouest du lac Tonga (Daia Zitoune) et à El-Aïoun au lieu dit Oued Djenan

### 1-2-2- Le tertiaire

Cet étage est constitué par des formations argileuses et des grès de Numidie

Les argiles de Numidie : Ces argiles, présentent des faciès de type flysch et constituent l'ensemble des plaines de la région d'El-Kala. Elles sont en réalité des marnes argileuses noirâtres, brunâtres ou verdâtres, quelques fois bariolées plus ou moins schisteuses avec interstratifications de petits bancs de grès quartziteux.

- Les grès de Numidie : Les massifs de la partie orientale du Tell algérien sont essentiellement constitués de grès de Numidie. Seules les vallées et les bassins internes montrent des roches différentes. Toutes ces formations constituent des nappes, ce qui leur donnent des caractères structuraux typiques :

\* Quartziteux, souvent blanchâtres, fortement consolidés, ils forment les principaux reliefs de la région.

\* Les grès d'âge Lattorfiens passent insensiblement aux grès de la Kroumirie de faciès identique, qui forment la masse principale des reliefs, aux confins de la région d'El-Kala et ils couvrent naturellement les synclinaux perchés de Brabtia.

\* Le modèle caractéristique du grès Numidien consiste surtout en de petites crêtes déchiquetées que remplacent parfois des pentes abruptes d'assez faibles dimensions.

En somme, le Nummulitique de la région d'El-Kala correspond à un milieu néritique relativement profond de l'éocène inférieur et moyen, tandis qu'à l'éocène supérieur et l'oligocène inférieur, se produit un soulèvement du fond de la mer provoqué par l'affaissement de la partie de la contrée précédemment émergée. Le flysch de l'éocène supérieur et l'oligocène inférieur (grès de Numidie et les argiles subordonnées) correspond à la plus large partie du sous-sol de l'ensemble de la contrée.

### 1-2-3- *Le quaternaire*

Dans les alluvions du quaternaire affleurent des éboulis de pentes qui ne sont autre que le résultat des phénomènes successifs d'érosion, d'altération, de transport et de dépôt. Ce sont des éboulis à bloc de grès numidiens de quelques centimètres à quelques dizaines de centimètres. On distingue différentes formations du quaternaire.

\* Dunes sublittorales : Situées au voisinage du lac Mellah et Oubeira avec une extension beaucoup plus importante à l'Est. De couleur jaune et légèrement consolidées, ces formations couvrent la majeure partie des environs de la ville d'El-Kala.

#### - *Les formations actuelles*

\* Sols de marécages : Les sols de marécages de la plaine orientale de Annaba sont constitués par les limons noirâtres. Les limons sont identiques et largement répandus dans les bas fonds de vallées entre les monts d'El-Kala et les dépôts des dunes littorales jusqu'à la bordure orientale du lac Oubeira, arrivant tout près du lac Tonga, au sud du lac Mellah ainsi qu'au sud de Bouteldja. L'imperméabilité de ces derniers est liée à l'extension des argiles de Numidie. Ces sols sont aujourd'hui le siège de toutes les cultures de la région.

\* *Les plages actuelles* : Ces formations sableuses se limitent à un affleurement très réduit, sous forme de cordon bordant le contact des grès de plages (mollasses) consolidés d'El-Kala. L'alimentation de cette plage est due à la désagrégation des grès des plages locales. Ces plages actuelles sont formées de sable quartzeux coquiller qui s'observe aux abords du Cap Rosa et d'El-Kala

### 1-3- *Relief*

Le relief du Parc se compose d'une juxtaposition de dépressions, dont certaines sont occupées par des formations lacustres ou palustres, et des hautes collines aux formes variées : Dôme, escarpements, alignements de crêtes généralement couverts par une végétation dense. Le long d'une coupe Nord – Sud, le relief passe de 0 à 1200m d'altitude en moins de 40 km (Benyacoub et al 2000 )

#### 1-3-1- *Le cordon dunaire littoral*

Il s'étend d'Ouest en Est sur une longueur de 40 km et se prolonge vers le sud jusqu'au pied de Djebel Segleb. Il est formé essentiellement de sable quaternaire. En se dirigeant de la mer vers l'intérieur des terres, quatre degrés de formations dunaires peuvent être identifiés : la plage à sable

blanc et dunes littorales dans la partie occidentale, les dunes sub-littorales à sable gris à l'Est et enfin les dunes intérieures à sable rougi par les dépôts d'oxyde de fer plus à l'est. On reconstitue en fait, de la mer vers l'intérieur des terres, un gradient de degrés de fixation ou de fossilisation des dunes.

Les dunes mortes sont les plus anciennes donc les plus éloignées de la mer. Elles sont colonisées par une végétation dense (chêne Kermes) bien stabilisées, même en cas de destruction du couvert végétal par le feu. Elles sont remises en mouvement lorsque l'homme y intervient par l'exploitation immodérée du sable et la destruction de tout le chevelu racinaire, qui constitue le principal élément de cohésion. Les principales dunes sont celles de Cap Rosa, de Mezira, et de la Messida.

#### 1-3-2- Les plaines sublittorales

Elles présentent un relief plat à ondulé et occupent environ 33% du territoire de la wilaya. Au sud, elles sont caractérisées par les alluvions et permettent des cultures très variées. Au Nord, elles se réduisent à une série de petites vallées que draine l'oued Kebir-Est. A partir de là, on rencontre une multitude de cuvettes et dépressions inter-collinaires occupées par des lacs et des étangs de toutes tailles. L'altitude n'y dépasse pas 600 m.

#### 1-3-3- Les montagnes telliennes

Une partie du versant Nord de la chaîne de Medjerda s'élève pour atteindre une altitude moyenne de 1100m. Le point culminant est le Djebel Ghorra (1202 m). Les monts de la Medjerda, dont les lignes de crêtes sont approximativement orientées Ouest, Sud-Ouest - Est, Nord-Est, ont subi des phénomènes de torsion qui ont brutalement incurvé leur direction générale vers le Nord-Est. Des prolongements vers la mer de ce mouvement du relief sont observés en deux points particuliers : le Cap Rosa et le Cap Segleb.

Par ailleurs, le relief de la région se caractérise par un pendage important. En effet, 9% des pentes faibles, 11% des pentes moyennes et 80% de pentes fortes à très fortes constituent un trait majeur de la physionomie d'un paysage montagneux.

#### 1-4- Hydrogéologie

Du point de vue hydrogéologique, deux formations sont observées dans la région : les formations perméables et les formations peu perméables. Aux formations peu perméables appartiennent les grès et argiles numidiennes, ainsi que les limons et les argiles se trouvant dans les alluvions de l'oued El-Kebir. Leur perméabilité est faible. Elle varie entre  $10^{-8}$  m/s dans les argiles et les grès et

évolue par contre de  $10^{-7}$  à  $10^{-6}$  m/s dans les limons et les argiles alluvionnaires. (Benyacoub et al 2000 )

#### 1-5- Hydrographie

La configuration du terrain de la région d'El-Kala détermine trois systèmes d'organisation hydrographiques:

- la partie Sud-Est est drainée par trois Oueds : l'Oued Bougous, Ballouta et El Kebir. Ce dernier constitue le collecteur principal (Apports de  $245 \text{ Hm}^3/\text{an}$ ); il alimente les nappes dunaires et lors des crues, on assiste à la mise en eau des dépressions inter-dunaires.
- La partie orientale est caractérisée par plusieurs oueds en général à faible débit, ils s'écoulent en majorité dans la plaine d'Oum Teboul.
- La partie ouest est également parcourue par de nombreux oueds (El-Aroug, Mellah, Reguibet, Boumerchen, Dai El-Graa...), qui se déversent pour la plupart dans les lacs Mellah et Oubeira.

Tableau 1 : Principaux cours d'eau du PNEK.

Principaux Oueds	Longueur (Km)	Exutoire
Oued Reguibet	8	Mellah
Oued Nhal	3,5	Plage Cap Rosa
Oued Mellah	7	Mellah
Oued El-Aroug	5	Mellah
Demat Rihane	1,5	Oubeira
Boumerchen	2	Oubeira
Dai El-Graa	5	Oubeira
El-Areug	10	Tonga
El-Hout	14	Tonga
Bougous	24	Mexa
Sbaa	4	Oued El-Kebir
Bouredim	5	Bouredim
Messida	10	Oubeira - El Kebir
El-Kebir	35	Mafrag

### 1-5-1- Les lacs

#### Ø -Le Lac Oubeira

C'est un site de 2200 ha, profond de 4 mètres au maximum. Il s'inscrit dans un quadrilatère de 5 x 4 km et développe 19 km de rives. Son bassin versant a une surface de 125 Km<sup>2</sup> dont 40 Km<sup>2</sup> en terrain plat et 85 Km<sup>2</sup> en collines. Fonctionnant de manière endoréique, il est alimenté par une dizaine d'oueds. En hiver, à l'occasion des fortes précipitations, les eaux de l'Oued El-Kebir parviennent au lac principalement par l'oued Messida qui prend naissance au sud. En été, quand le niveau de l'oued El-Kebir est au plus bas, le système hydrologique fonctionne en sens inverse, la Messida ayant la particularité de couler dans les deux sens.



Figure 1 10 :Lac Oubeira

#### Ø Le Lac Tonga

Il occupe une vaste dépression côtière d'une superficie de 2200 ha environ, et s'étend sur 7,5 km de long et 4 km de large. IL est limité sur toute sa moitié Ouest, Sud et Est par les derniers contreforts des montagnes de la Kroumirie, au Nord-Ouest par les collines sableuses qui le sépare du lac Oubeira et au Nord par les dunes qui le sépare de la mer. D'une profondeur moyenne de 1 à 1,5 m, il est relié à la mer par le canal de la Messida. Son bassin versant plus important que celui de l'Oubeira s'étend sur 155 Km<sup>2</sup>. En effet, Nous distinguons deux sous bassins versants, celui de Oued El-Hout au Sud et celui de Oued El-Eurg au Nord.



Figure 1 11:Lac Tonga

#### Ø *Le Lac Mellah*

C'est une ancienne vallée fluviale envahie par la mer et qui s'est transformée en lagune, celle-ci est reliée à la mer par un chenal. D'une profondeur maximale de 6 m et d'une profondeur moyenne de 2,5 m, sa superficie est de 860 ha. Le Mellah est alimenté surtout par Oued El-Aroug, Oued Mellah et Oued Reguibet. son bassin versant couvre une superficie de 77 Km<sup>2</sup>.



Figure 1 12 :Lac Melah

## 1-5-2- Les sources

De nombreuses sources existent dans le territoire du Parc, les plus importantes étant celles de Bougles, Bouredim et El-Bhaim qui totalisent un débit de 150 l/s soit un débit de 12.700m<sup>3</sup>/j. Le reste des sources (environ 40) réparties à travers le territoire du Parc où sa périphérie possède un débit variable de 0,5 l/s à 10 l/s. (Benyacoub et al, 2000 )

Tableau 1 2 : Principales sources du PNEK

Sources	Débits (m <sup>3</sup> /j)
Ain Boumalek	17
Boulif	300
Ain Darrdara	28,5
Kanguet Aoun	29
Source El-Hammam	9,9
Ain Laiche	18
Ain Souani	9
Ain S/Belgacem	3,6
Ain Melloul	9

### 2-1- Caractères climatiques

Les données fragmentaires sur la climatologie de la région ne permettent malheureusement pas de dresser un tableau détaillé des conditions climatiques qui y règnent. Si le mésoclimat reste connu dans ses grands traits, il reste que bien des faits, tels que la nature et la répartition de la végétation par exemple, ne peuvent s'expliquer que par la présence d'un climat plus localisé dont nous ne connaissons aucune caractéristique. En effet, dans une région où les reliefs jouent selon leur position, le rôle d'ombre ou d'aimant pluviométrique où les zones humides en tamponnant localement l'atmosphère, réduisent le caractère xérique de la période estivale et où d'une manière générale, la plus petite variation du facteur limitant que constitue l'humidité se répercute immédiatement sur la végétation, il est nettement insuffisant de n'avoir à sa disposition que des données très fragmentaires. Nous nous contenterons donc de brosser un tableau, nécessairement incomplet, des différentes caractéristiques du mésoclimat.

#### 2-1-1- La température

D'une manière générale, la région d'El-Kala est située dans le méditerranéen chaud avec une température maximale pouvant atteindre 50°C Les températures les plus basses sont naturellement enregistrées en altitude durant l'hiver au Djebel Ghorra, avec environ 5 à 6 mois de gelée blanche par an. Au niveau de la mer, les températures descendent très rarement à 0°C. Les mois les plus froids sont janvier et février alors que juillet et août sont les plus chauds. (Benyacoub et al, 2000)

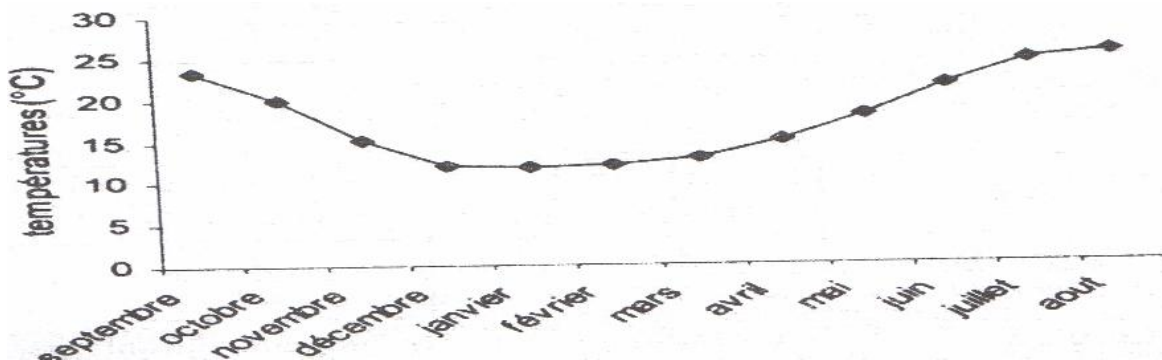


Figure 1 13 : Température moyennes mensuelles de 1968 à 2000 (Djebar et al, 2003)

### 2-1-2-Les précipitations

Trois types de précipitations caractérisent le climat de la région :

- La pluie présente un régime typiquement méditerranéen, avec une saison humide de novembre à avril où le bilan hydrique est positif, et une saison sèche de mai à octobre où le même bilan est négatif.
- La neige, dont l'apparition se fait au mois de janvier et février sur les sommets et qui peut descendre jusqu'à 700 mètres d'altitude. En raison de son caractère irrégulier et surtout peu déterminant par les processus généraux de répartition des organismes dans la région, nous n'en tiendrons pas compte.
- La nébulosité, dont la proximité de la mer, l'importance des zones humides et une température atmosphérique moyenne élevée, favorisent sa présence et son maintien à des taux élevés. Son rôle est surtout important durant la saison sèche car elle atténue quelque peu les conditions de déficit hydrique.

#### Ø *La pluviosité*

La pluviosité de la région est conditionnée par deux phénomènes météorologiques principaux. D'une part, les perturbations cycloniques d'origine atlantique de l'Ouest et du Nord-Ouest qui, après avoir traversé l'Espagne et une partie de la Méditerranée Occidentale, affectent le Nord-Est Algérien. Et d'autre part les dépressions qui prennent naissance en Méditerranée occidentale, généralement centrées dans le périmètre «Golfe de Gênes-Corse-Sardaigne».

Les pluies en Algérie étant surtout d'origine orographique, le gradient altitudinal va donc fortement conditionner la pluviosité. Les points les plus arrosés seront de ce fait les zones sommitales avec une moyenne d'environ 1200 mm/an pour El-Fedden et Djebel Ghorra. La pluviométrie annuelle à El-Kala est de 910 mm pour 115 jours de pluies.

Une des caractéristiques de la pluviosité dans la région réside dans sa grande variabilité mensuelle, avec une concentration de la totalité des précipitations sur quelques mois de l'année. Ce phénomène a pour corollaire une grande violence et un caractère orageux des chutes de pluies, caractéristique du climat méditerranéen dans son ensemble. Ce phénomène n'est pas sans effet sur le relief dont la dissection témoigne d'une érosion intense.

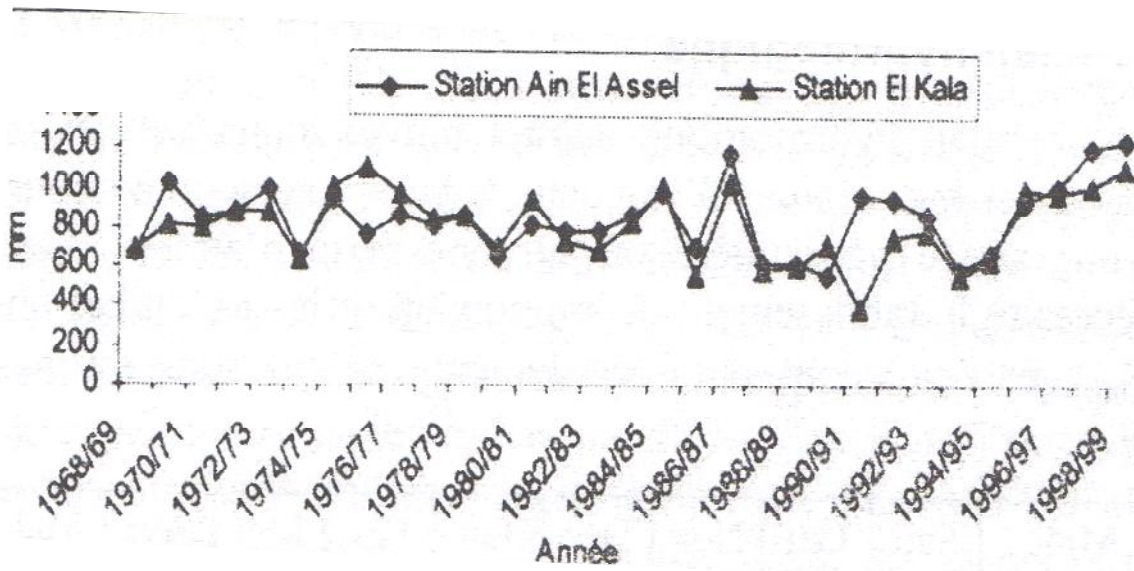


Figure 1 14 : Précipitations annuelles moyennes de 1968 à 2000(Djebar et al ,2003)

Les moyennes pluviométriques obtenues sur le période de 1968-2000 varient entre 390mm (en 1990/1991) et 1243 mm en 1999/2000 (figure 1 14).

#### Ø La nébulosité

Ce facteur, désigné comme précipitation «oculte», n'a jamais été intégré dans les données climatiques malgré son caractère quasi permanent durant le printemps et le début de l'été. La proximité de la mer et les étendues de zones humides en sont les principaux responsables. La mer joue un rôle de condensateur des masses d'air tropicales, tandis que les zones humides subissent une évaporation intense du fait de l'ensoleillement. Il en résulte une humidité atmosphérique élevée qui se transforme, notamment au début du printemps, en brume qui recouvre souvent les hauteurs du Djebel Ghorra ainsi que les vallées basses et les zones humides. Durant une partie de la saison sèche, cette nébulosité est certainement favorable au maintien d'une végétation éprouvée par un important déficit hydrique.

#### 2-1-3-Les vents

Ils jouent un rôle important et sont souvent liés aux pluies d'équinoxes, qui apportent les précipitations les plus importantes venues de l'Atlantique. Les vents du Nord-Est sont assez fréquents mais sont néanmoins faibles et leur action sur le milieu est peu importante. Quant aux vents du Nord-Ouest, ils soufflent avec une régularité importante en hiver et plus modérée en été.

Notons la manifestation d'un vent chaud du sud : le Sirocco. Ce dernier est un phénomène à caractère local qui peut souffler avec intensité et qui varie d'une zone à une autre. Le maximum de fréquence est généralement au mois d'août, où ses effets sont des plus désastreux sur la végétation.

En effet, le Sirocco combiné à un état de déficit hydrique assèchant l'atmosphère et élevant les températures, favorise l'apparition de violents incendies de forêts (incendie de l'été 1983 et celui de 1993).

### 2-2- Caractères bioclimatiques

D'après le climagramme d'Emberger, la région d'El-Kala est localisée dans l'étage bioclimatique sub-humide à hiver chaud, à la limite de l'étage humide. Cependant les reliefs vont largement déterminer l'existence de sous étages qui vont eux-mêmes influencer sur la diversité phytosociologique des habitats. En effet, la zone du Parc National se révèle être une véritable mosaïque d'étages bioclimatiques de végétation. Sans rentrer dans le détail des effets de versant ou des conditions écologiques locales, nous pouvons distinguer deux étages bioclimatiques de végétation : l'étage sub-humide et l'étage humide.

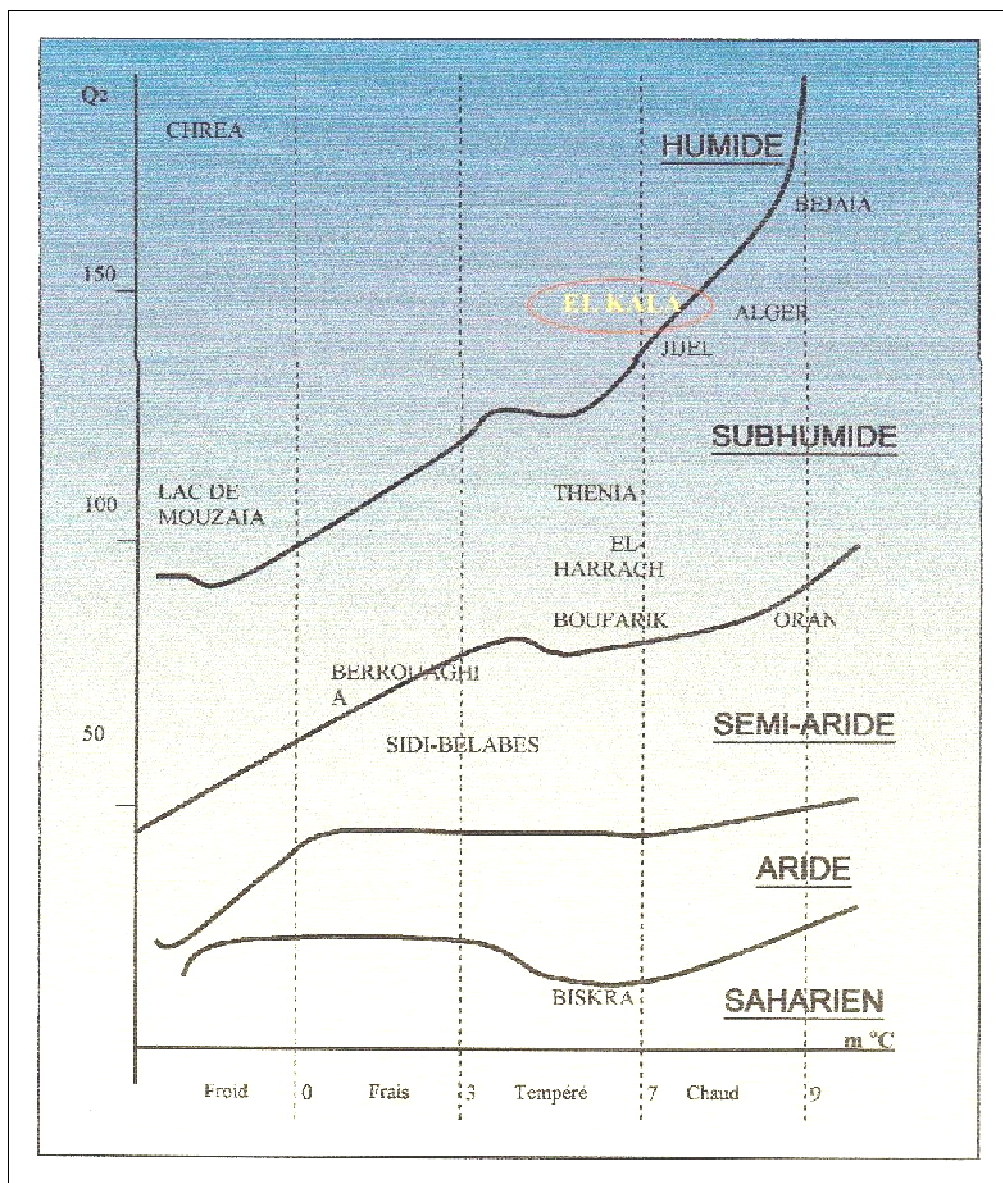


Figure 1 15 : Situation d'EL Kala dans le climagramme d'Emberger (1953)

### 2-2-1-Etage Sub-humide

L'étage sub-humide à hiver chaud peut s'inscrire dans l'étage thermoméditerranéen tel qu'il a été défini par Ozenda. Il se caractérise par l'aire de l'Oléolentisque à Caroubier au niveau de la mer et par celle de l'Oleolentisque à myrte à un niveau altitudinal supérieur. Par ailleurs, il est caractérisé également par la série du Chêne Kermes en situation côtière sur substrat dunaire.

### 2-2-2-Etage humide

L'étage humide à hiver chaud à tempéré peut être assimilé au mésoméditerranéen d'Ozenda. Cet étage correspond à l'aire du chêne-liège (*Quercus suber*). Celui-ci s'associe en deux groupements selon le jeu complexe des conditions d'humidité et, dans une moindre mesure, de sol. Ceux-ci conditionnent l'intensité de la compétition avec des espèces ou des groupements concurrents. Dans tous les cas, il constitue la seule espèce arborée du groupement.

Ainsi nous pouvons distinguer du niveau le plus thermophile à basse altitude, au moins thermophile à haute altitude, deux groupements principaux : le groupement à *Quercus suber* et *Pistacia lentiscus* marginalisé dans les niveaux les moins humides et les plus chauds. Ce groupement est infiltré par des espèces thermophiles telles que *Calycotome*, *Phillyrea*, *Erica*, *Cistus*... et le groupement à *Quercus suber* et *Cytisus triflorus* qui prend le relais du précédent à partir de 500 à 700 m d'altitude, selon l'orientation du versant. A partir de cet étage nous sortons réellement de l'ambiance générale de maquis pour rentrer dans une ambiance forestière de type tempéré.

L'étage humide à hiver tempéré à frais se manifeste au-delà de 800 à 900 m d'altitude. Il correspond au supraméditerranéen d'Ozenda et se caractérise par l'aire de *Quercus faginea mirbeckii*. Essence caducifoliée, le Chêne zeen se développe lorsque la pluviométrie est supérieure ou égale à 900 mm/an. Il forme alors des peuplements denses dont les arbres peuvent atteindre 30 m de haut. Il est associé en groupement à *Cytisus triflorus*, *Rubus ulmifolius*, *Crataegus monogyna*...

ces régions et de son influence sur la flore et la végétation (Benyacoub et al, 2000)

## 1- Choix du matériel végétal

Les conifères sont des arbres peu exigeants, susceptibles de se développer dans les sols les plus pauvres. Ils secrètent des huiles essentielles et des résines qui leur communiquent une odeur vive, d'où le nom résineux.

*Pinus maritima* et *Pinus halepensis* ont été choisis parmi les espèces aromatiques, en raison de leur abondance.

## 2-description des sites de prélèvement

Tableau 1 4 : Situation géographique de différentes stations. (Google earth)

Stations	Cordonnés	
	Nord	Est
Forêt de Hadada	36°54'25''	8°37'22''
Forêt de Tonga	36°52'46''	8°31'04''
Forêt de Embochure (lac Mellah)	36°54'35''	8°18'37''
Forêt de Zarouria	36°14'46''	7°59'

## 2-1- La Forêt de Hadada :

La zone de Hadada est située au Nord Est du chef lieu de la commune de Souarekh à proximité du C.W.37. Frontière avec la Tunisie ; au sud elle est limitée par la commune d'el Aioun et Ramel Souk, à l'Ouest par la commune d'El kala et à l'est par la frontière Algéro-tunisienne.

Superficie de la forêt 772ha

Sol : sablonneux, limoneux, argileux. Orientation : Ouest .



Figure 1 16: Site de la forêt de Hadada

## 2-2-La Forêt de Tonga

La pinède de Tonga est située la rive Nord-Ouest du Lac Tonga limité au Nord par la route nationale d'El Kala et au sud par le lac Tonga

Superficie 700.4ha ; Altitudes 27 à 75m ; sol : sablonneux plus ou moins sec riche en débris organiques

Orientation : sud



Figure 1 17 : Site de la forêt de Tonga

## 2-3- La Forêt de l'embouchure du lac Mellah

Elle est située dans la rive Ouest de l'embouchure du lac Mellah limitée à l'ouest par le Cap Rosa et au Sud village du Cap Rosa à l'Est lac Mellah .

Sol : sablonneux. Orientation : Est



Figure 1 18: Site de la forêt de Embouchure ( lac Mellah )

#### 2-4-La Forêt de Zarouria



Figure 1 19: Site de la forêt de Zarouria (google earth)

La station da Zarouria se localise dans la wilaya de Souk Ahras à l'est de la route national N16

(voir figure 1 19)Sol : calcimagnétique , riche en calcaire

Altitudes 680m

Orientation : Nord

Toutes les espèces étudiées sont des peuplements à l'état naturel sauf, les pinèdes de Tonga qui sont des reboisements.

#### 3- Méthode d' Echantillonnage

Nous avons choisis "l'échantillonnage au hasard" qui consiste à prélever au hasard de diverses localisations les échantillons à étudier. (Bourkhiss et al ,2007).

Pour chaque espèce nous avons procédé à la cueillette des feuilles jeunes, qui se situent donc, dans le dernier segment des rameaux inférieurs des différents pieds de Pinus :

- *Pinus halepensis mill* , provenant de la forêt de l'Embouchure au (P.N.E.K) et de la forêt de Zarouria (Souk Ahras ).
- *Pinus maritima*, provenant de la forêt de Tonga et Hadada au (P.N.E.K).

La cueillette a été réalisée tôt le matin, au moment de la floraison entre mars –avril 2007, par temps sec pour éviter toutes altérations des HE. Les feuilles ou aiguilles sont séchées au laboratoire dans un endroit aéré et propre à l'abri de la lumière.

#### 4- Etude ethnobotanique

L'ethnobotanique est considérée comme étant l'ensemble des pratiques et des savoirs d'un groupe humain sur son environnement végétal, il s'agit alors d'inventorier et d'analyser les faits culturels nés de la rencontre entre sociétés et leur environnement végétal, l'attention a tous les aspects des rapports entre anciens et actuels des sociétés avec la plante comme remède. (Vilayleck, 2002)

Nous avons établie une fiche d'enquête, dans le but de rassembler le maximum d'informations sur les intérêts thérapeutiques du pin dans la région d'Annaba

Fiche d'enquête			
Age .....	Sexe .....	Profession .....	
Wilaya .....			
Arbre le Pin (snouber)			
Connaissez –vous cette arbre (le Pin ) ? Oui <input type="checkbox"/> ou Non <input type="checkbox"/>			
Description de la plante .....			
Pour quel maladie utilisez vous cette plante ?.....			
Quel partie de la plante vous utilisez ? Ecorce <input type="checkbox"/> feuille <input type="checkbox"/> aine <input type="checkbox"/> hmeaux <input type="checkbox"/>			
Bourgeons      Résine      ou autre .....			
Quel est le mode d'utilisation ? infusion <input type="checkbox"/> décoction <input type="checkbox"/> macération <input type="checkbox"/> poudre <input type="checkbox"/>			
teinture			
Autres.....			
....			

(D'après Grenand, 2004 et Djedi 2008)

## 5 Tests phytochimiques préliminaires des feuilles de *Pinus maritima* et *Pinus halepensis* :

Test des alcaloïdes :

1 g de la plante séchée et broyée sont mélangés avec 10ml d'HCl à 5% dans un récipient.

Après une demi heure de macération, on filtre le mélange, on additionne au filtrat quelques gouttes de réactifs de Mayer l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence d'alcaloïde. (Grenand, 2004)

Test des saponosides :

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse dégréé de dilution d'un détecté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Deux grammes de matériel végétal sec broyé à tester sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau distillée .On porte à ébullition pendant 30min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tube (1.3cm de diamètre interne) avec de 1, 2,...10ml, le volume final étant réajuste à 10ml avec de l'eau distillée .

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes .Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le X<sup>e</sup> tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante : I=hauteur de la mousse persistante en cm dans le X<sup>e</sup> tube (Dohou et ,2003)

Test des Flavonoïdes :

10g de drogue pulvérisée sont macérés dans 150ml à 1% d'HCl pendant 24 heures.

Après avoir filtré le mélange, on procède au test suivant :

On prend 10ml du filtrat, on le rend basique par l'ajout du NH<sub>4</sub>OH, après trois heures, l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube à essai indique la présence des Flavonoïdes.

Test des tanins :

10g de poudre sèche, sont placés dans 100 ml de MeOH à 80% .Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes .L'ajout de gouttes d'une solution de FeCl<sub>3</sub> à 1% permet de détecter la présence ou non de tanins .La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtres en présence de tanins catéchiques (Dohou et ,2003)

Test des cardénolides :

1g de poudre sèche est macéré dans 20ml d'eau distillée pendant 3 heures, après filtration, on prélève 10ml de filtrat et on l'extrait avec un mélange de 10ml de CHCl<sub>3</sub> et de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> OH.

On évapore, la phase organique dans un bain de sable T 90°, puis on dissout le précipité dans 3ml de CH<sub>3</sub>COOH glacial, en ajoutant quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> et 1ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré sur les parois du tube à essai. L'apparition d'une couleur vert-bleu dans la phase acide indique la présence des cardénolides.

Test stéroïdes et terpènes :

5g de poudre séchée (échantillon), sont dissous dans 20ml d'éther de pétrole, filtrés, puis évaporés. Le résidu obtenu est dissout dans 0,5ml d'acide acétique auquel on ajoute 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Dans la zone de contact entre les deux liquides, il se forme un cercle violet ou marron, lorsqu'il devient gris, ceci indique la présence des stéroïdes et terpènes.

6 le taux d'humidité :

6-1Principe :

Le degré d'humidité est mesuré par pesée d'un échantillon qui vient d'être prélevé, puis par dessiccation des feuilles dans un four, suivi d'une nouvelle pesée .La perte de poids (eau) s'exprime en pourcentage du poids anhydre.

6-2Mode opératoire :

Peser un échantillon de 10 g(à 0.01 g près ) (p1)

Placer l'échantillon dans une étuve à 70°C. Sécher jusqu'à poids constant (24 h )

Laisser refroidir 30min au dessiccateur peser avec une précision de 0,01g près (p2)

6-3Calcul du taux d'humidité

$$D'humidité (\%) = \left( \frac{p1-p2}{p2} \right) \times 100$$

P1 poids frais

P2 poids sèches (Kalra et al, 1992)

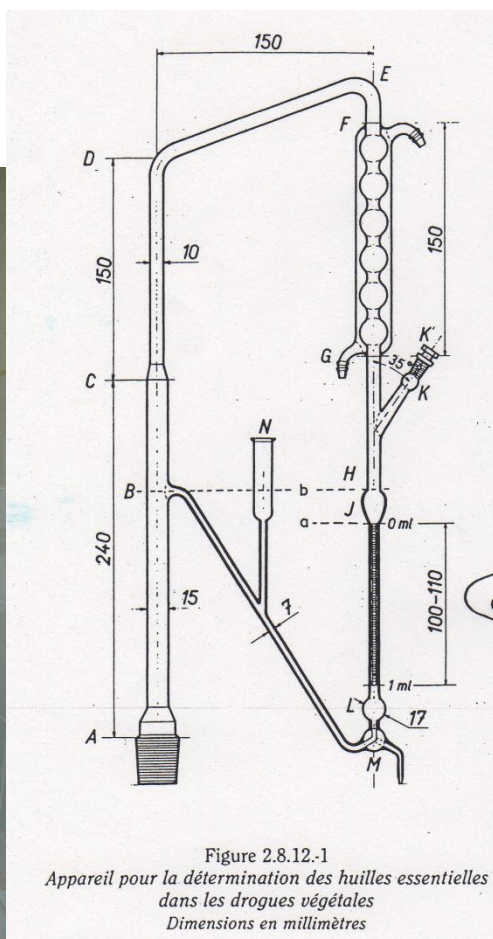
7 Extraction des huiles essentielles

### 7-1-Principe

Les huiles essentielles ont été isolées par hydrodistillation en utilisant l'appareil figurant dans la 5ème édition de la Pharmacopée européenne. Qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans de l'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Garnero, 1996)



Figure 1 20 : Appareil Hydrodistillation



### 7-2-Mode opératoire :

Extraction

1-100 gr d'échantillon de feuilles sèches de pin , placé dans le ballon, est additionné de 250 ml d'eau

2- le ballon est adapté à l'appareil de condensation (A)

3-de l'eau est versée par le tube de remplissage (N),jusqu'à l'effleurement en (B), ceci permet de monter un circuit fermé pour garder un niveau constant d'eau dans le ballon

3-le chauffage du ballon débute et au moment de l'ébullition nous débutant entrainement a la vapeur d'eau qui dure 3h

4-Condensation du mélange à l'aide d'un réfrigérant à eau formant deux phases liquides :

-une phase organique supérieure (huiles essentielles)

-une phase aqueuse inférieure, dite eau aromatique

A l'aide du robinet, l'huile essentielle est amené au niveau du tube gradué. juste au niveau ( J),pour la mesure du volume de l'huile essentielle distillée (Pharmacopée Belge ,1982)

- Les huiles essentielles sont stockées au laboratoire d'analyse, dans de très petits flacons de verre opaque, parfaitement bouclés, et tenus à 4 °C. (Vincent, 1991)

7-3-Calcul du rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE et la masse de la matière végétale utilisée (Benyoucef et al ,2005)

Avec la formule suivante

$$R\% = \frac{PHE}{PMV} \times 100$$

R : rendement

PHE : poids d'huile essentielle (g)

PMV : poids de matière végétal en(g)

## 8-Analyse quantitative et qualitative

### 8-1 Identification par CCM

#### 8-1-1 Principe :

la chromatographie sur couche mince est une technique de séparation dans laquelle une phase stationnaire constituée d'un matériau approprié, est répandue en une couche mince et uniforme sur un support (plaque) de verre, de métal ou sur une feuille appropriée .la solution du mélange inconnu est déposée à la ligne de départ sous forme d'un point ou d'un trait. La plaque ou la feuille est introduite dans une cuve étanche contenant l'éluant approprié (phase mobile).la séparation des constituants du mélange s'effectue grâce à l'ascension par capillarité de la phase mobile le long de la phase stationnaire (développement).ensuite, les substances incolores seront rendues visibles (détection).(Stahel et al,1975)

#### 8-1-2 Mode opératoire

1-Mélanger 1ml HE à examiner avec du toluène et compléter à 10 ml avec le même

2-support (phase stationnaire ) :kieselgel GF<sub>254</sub>

3-Eluant (phase mobile ) :ACETATE d'éthyle , toluène (5 :95) ,séchage intermédiaire 5 min ,température ambiante .

4-Développement sur un parcours de 15 cm

5- Détection UV<sub>254</sub>

5-solution à analyser

6-On dépose 10µl.

7-Pulvériser avec une solution d'aldehyde anique et chauffer à 100-105°C pendant 5 à 10 mn puis examiner à la lumière du jour pour la révélation :

La Couleur rose indique la présence de  $\alpha$ -Pinène

La Couleur gris rose indique la présence de Linalol

La Couleur violette ou villette brun indique la présence  $\beta$ -terpineol (Pharmacopée européenne ,2005)

## 8-2-La Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

### 8-2-1-Principe

Chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation chromatographique reposant sur la distribution différentielle des espèces entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire contenue dans une colonne et un gaz vecteur, comme phase mobile, qui traverse cette phase stationnaire.

La CPG est fondée sur les mécanismes d'adsorption, de distribution de masse ou d'exclusion (Mehuzier, 1978) , (Tranchant,1995),(Tranchant,1996)

Le principe de la spectrométrie de masse (SM) consiste à provoquer l'ionisation d'une molécule, et d'en analyser les fragments qui seront séparés, en fonction de leur masse.

L'ionisation peut se faire selon deux mécanismes, tels que : l'impact électronique ou encore l'ionisation chimique.

Cette opération aboutit à la formation de fragments, qui seront accélérés, jusqu'à un analyseur.

Ce dernier permettra de les séparer en fonction de leur rapport m/z

L'avantage du couplage CG/SM est que l'identification d'un composé par le SM nécessitait des travaux de séparation et de purification très longs, qui, sont par le couplage à la CPG, en partie supprimés.

Le spectre de masse obtenu, montre plusieurs pics dits à l'ionisation de la substance, ces pics correspondant à un fragment m/z et d'un Tr donnés, alors que le chromatogramme montre lui un pic correspondant à une substance isolée, et qui est caractérisée par le Tr. (Rehamnia ,2003)

### 8-2-2-Mode opératoire

La composition chimique des huiles a été déterminée par la technique de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée avec la Spectrométrie de Masse (CG/MS) sous les conditions opératoires suivantes :

- L'analyse quantitative a été effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de marque couplée au spectromètre de masse de type Shimadza équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et muni d'une colonne capillaire en silice fondue de type QP2010C25 FS-OV1701 de 25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25µm d'épaisseur de film.

La température de la colonne est programmée de 60 à 220 °C à raison de 3°C/min.

La température de l'injecteur est fixée à 240 °C et celle de détecteur (FID) à 250 °C.

Le débit de gaz vecteur (Helium) est fixé à 1.5ml/min.

Le volume de l'échantillon injecté est 0,1 µl de l'huile pure diluée à 10% dans l'hexane.

Le pourcentage de chaque composé au sein de l'huile est déterminé à partir des aires des pics sans tenir compte des facteurs de correction en supposant que tous les constituants ont des coefficients de reponse voisines. (Stenhagen *al*, 1976)

- L'identification des constituants (hélium) est fixée à 20 psi. Le volume injecté de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention sur la colonne (calculés par rapport aux temps de rétention d'une série d'alcane linéaires (C9-C28)) avec ceux de produits de référence et par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une bibliothèque commerciale (ov.17/GCMS Real time analysis). (Tsitsimpikou, 2001)



Figure 1 21: chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectrophotométrie de masse

#### 9- Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles (aromatogramme)

A fin d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de pin extraites, un aromatoigramme à été réalisé sur des souches bactériennes Selon la méthodes NCCLS(national committee of control laboratory standard)

Aromatoigramme a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie à USM d'Annaba

Souches

Les souches bactériennes proviennent du laboratoire de microbiologie au niveau du CHU/Dorban de Annaba

Ø Souche de *Staphylococcus aureus*

Ø Souche de *Pseudomonas aeruginosa*

Ø *Escherichia coli*

#### 9-1Principe :

La technique utilisée est celle en milieu solide , se fait sur milieu MH, représente la base de la classification des huiles essentielles, complété ensuite par l'étude de la C.M.I les colonies disparaissent dans l'air de diffusion de l'huile essentielle.( Vincent,1991)

#### 9-2- Mode opératoire

Préparations des suspensions

Pour chacun une des souches bactériennes qui ont été repiquée sur gélose nutritive (obtention de souches juvéniles) et entretenue dans une chambre froide.

A l'aide d'un écouvillon , on a prélevé des Colonies bien isolées sur milieu solide sont suspendu dans de l'eau physiologique stérile donnant  $10^6$  a  $10^8$  CFU/ml qui correspond a un standard a 0,5farlandpuis bien agiter

Ensemencement

Il s'agit du milieu de MH (Mueller –Hilton ) préalablement fondue et refroidi à 45°C'est coulé sur des boîtes de Pétri de 90mm Ô

A l'aide d'un écouvillon stérile en introduit celui ci dans la suspension puis essorer au port puis ensemencez les milieux des boîtes de Petrie

A l'aide d'écouvillon stérile, on réalise des stries serrées en effectuant 3 rotations de 60°( Berredjem,2000)

Application des disques

A l'aide d'une pince stérile on a déposé des disques de papier buvard (préalablement découpés à l'aide d'un perforateur et stérilisés à l'autoclave) de 6 mm de diamètre. Après avoir imprégner les disques dans l'huile essentielle en place dans les boites de Pétrie, on respecte l'espace entre les disques

Incubation

Incubation des boites de Petrie dans incubateur a une température de 37°C pendant 24h à 48h

( Vincent,1991)

Lecture

Mesure le diamètre de la zone d'inhibition autours des disques à l'aide d'un pied à coulisse mm Ô

10- Etude Histologie

10-1Principe

L'utilisation différentielle de colorants plus au moins spécifiques, agissant sur les parois ou le contenu cellulaire, facilite l'observation et la reconnaissance des tissus dans un organe.

La double coloration d'anatomie les plus intéressantes s'opposent On utilise le rouge Congo /vert d'iode

La Couleur des Celluloses et pectines en Rose à rouge

La Couleur des lignines et Subérines en Vert à bleu

10-2 Mode opératoire

- Les feuilles fraîches coupées sont ensuite conserver dans l'alcool à 80 %
- Préparer une boite de Pétrie remplie d'eau distillée pour recueillir les coupes
- On utilisons lame de rasoir neuve on établie des coupes perpendiculaire au plan de coupe et très minces des aiguilles (feuille)de pin
- On élimine les coupes très épaisses puis on passe au différent traitement pour l'obtention d'une coloration
- On place les coupes dans l'eau de javel diluée, pour vider le contenu de la cellule pour ne conserver que la paroi

Attendez 10 à 20 min en vitrifiant de temps a autre que les coupes trempent, et ne pas dépasser 1/2h pour éviter l'attaque des parois cellulaires.

- Rinçage des coupes a l'eau (trois bain de quelque secondes).
- Passage a l'acide acétique a 5% pendant 5 min, a fin de fixer les colorants
- Puis dans la soude pendant quelques secondes

- Placer les coupes dans le premier colorant le vert de méthyle pendant 5 min puis on effectue un rinçage à l'eau
- Placer les coupes dans le deuxième colorant le rouge Congo pendant 15 min puis un rinçage à l'eau
- Les coupes doivent rester dans de l'eau sinon elles se dessèchent rapidement, on place une coupe entre lame et lamelle avec une goutte d'eau et on observe au microscope optique. (Ibdri, 2006)

## 2-Résultats des essais phytochimiques préliminaires :

Nous avons recherché dans les feuilles des deux espèces *Pinus maritima* et *Pinus halepensis* les principales classes des métabolismes secondaires, à savoir alcaloïdes ,saponines ,tanins ,et flavonoïdes .Les résultats obtenus des recherches phytochimiques préliminaires sont représentés dans le tableau ci-dessous

Tableau 1 7 : Résultats des analyses phytochimiques préliminaires

Noms des principes actifs	<i>Pinus maritima</i>	<i>Pinus halepensis</i>
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	++	++
Tanins	+++	+++
Saponines	+	++
Terpènes et stérols	++	++
Cardinolides	-	-

(-)non détecté      (+) détecté

Les tests phytochimiques nous ont révélé que :

- ∅ la présence d'une forte teneur en tanins et flavonoïdes pour les deux espèces
- ∅ La présence de terpènes et stérols en quantité moyennement riche dans les deux espèces.
- ∅ Les saponines sont présentes pour les feuilles de *Pinus maritima* en quantité plus ou moins faible avec un indice (I=100) alors que pour les feuilles de *Pinus halepensis* moyennement riche.(I>100)
- ∅ Pour le test des alcaloïdes aucun précipité n'a été observé pour l'extrait des feuilles des deux espèces *P.maritima* et *P halepensis* donc absence des Alcaloïdes
- ∅ Le test n'a pas permis de mettre en évidence l'existence des cardinolides dans les feuilles des deux espèces.

### 3 -Taux d'humidité

D'après la figure <sup>1</sup> 23 nous avons remarquer que le taux d'humidité des feuilles de *Pinus maritima* est plus élevé par rapport a celui du site Hadada et cella est expliquer par la présence du site tous prés du lac Tonga .

Alors que le taux d'humidités de *Pinus halepensis mill* est plus élevé au niveau de l'Embouchure que celui de Zarouria qui se trouve a Souk Ahras malgré que de l'Embouchure se situe dans un climat Sub humide

Tableau <sup>1</sup> 8 : taux d'humidités dans les différents sites

	Taux humidités
site 1	2.74%
site 2	9.13%
site3	5.05%
site 4	2.39%

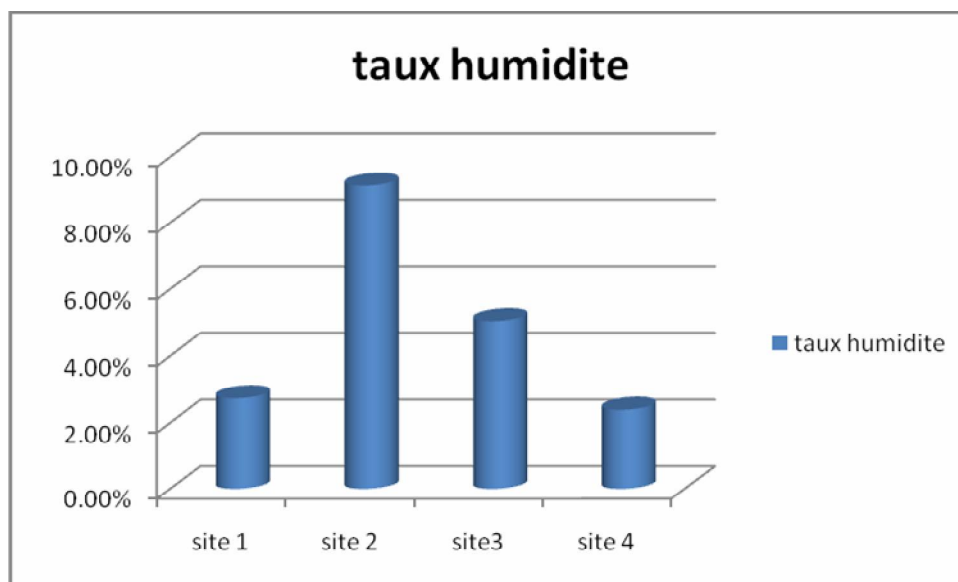


Figure <sup>1</sup> 6: Taux humidités

## IV – Les huiles essentielles

### 4.1 Propriétés Organoleptiques :

Les HE des deux espèces *Pinus halepensis mill* et *Pinus maritima* présentent des caractéristiques identiques :

- Aspect : liquide limpide, fluide et mobile
- Couleur : incolore à jaune pâle
- Odeur : fraîche et résineuse, légèrement tanisée

### 4.2 Le rendement en HE

Le rendement en HE des différents sites sont présentes dans le tableau <sup>1</sup> 9

Les résultats obtenu sont des moyennes de trois répétitions de trois échantillons pour chaque sites

Tableau <sup>1</sup> 9: Rendement en HE

Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
0,27%	0,18%	0,81%	0,3%

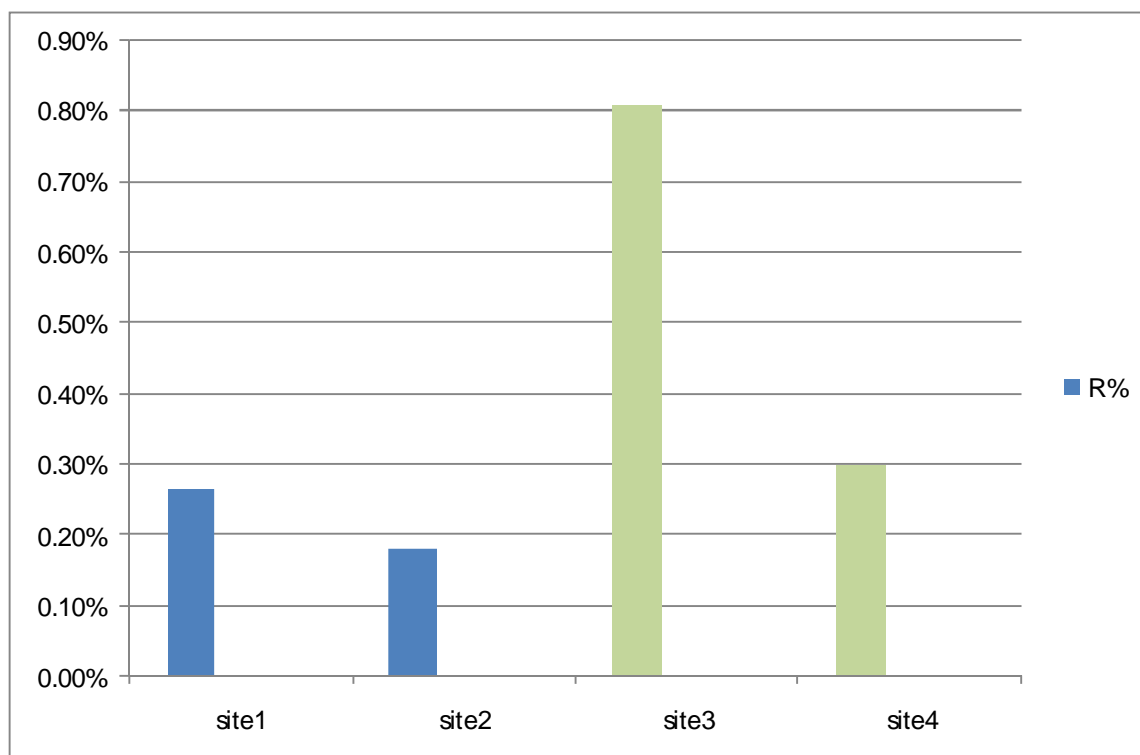


Figure <sup>1</sup> 7 : Rendement en HE

-le rendement en huiles essentielles est de 0,81% pour *Pinus halepensis* Mill d'Embouchure lac Mellah (site 3), et de 0,27% chez *Pinus maritima* de forêt de Hadada (site 1) et de 0,18 % de forêt de Tonga ( site 2)

-le rendement obtenu de *Pin maritima* cueilli de la forêt de Hadada est 0,27%, alors que de *Pin maritima* cueilli de la forêt de Tonga à donnée 0,18%. Ces rendements sont légèrement inférieurs à ceux obtenus dans l'étude de HE de Sidi fradj (Dob et al,2005) qui a obtenu un rendement de 0.3%

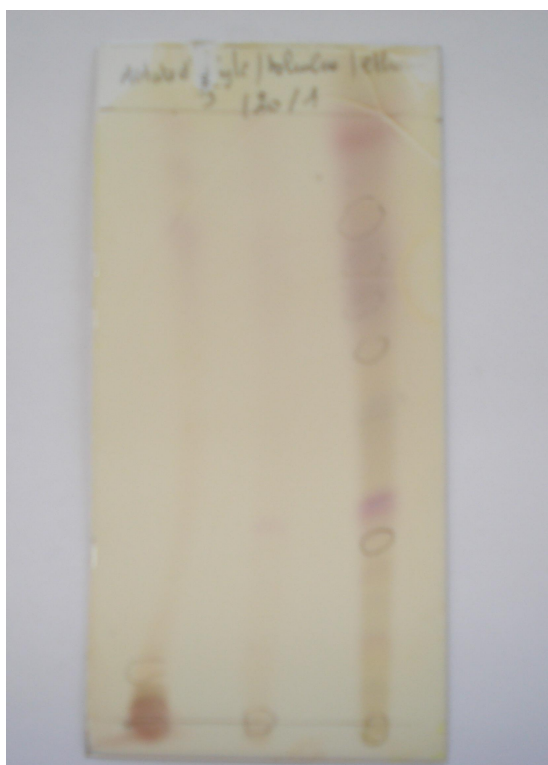
On remarque qu'HE *Pin maritima* de Hadada est supérieur au rendement de Tonga

Cependant lors de cette étude nous avons montré que le rendement est variable selon la localisation géographique. En effet le rendement de *P. halepensis* Mill de l'Embocure (lac Melah)(0,81%) est largement supérieur à celui de Zarouria (0,3%) et différent à ceux obtenus dans l'étude de HE de Sidi fradj (Dob et al,2005) qui a obtenu un rendement de 0.52%

On remarque qu'HE de *Pinus halepensis* Mill est plus supérieur que rendement de Zarouria ainsi que -le rendement des deux espèces est différent

- Nous constatons que le rendement en huile essentielle du *Pinus maritima* dans les deux sites est inférieur au rendement de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill (site 3).

## 5- LA CCM



De gauche à droite

H1 ::HE de *Pinus maritima* de Hadada

H2 ::HE de *Pinus maritima* de Tonga

H3 ::HE de *Pinus halepensis* de lac Mellah

Figure 1 28 : identification par CCM

Les deux HE1 et 3 ont migrés sur la plaque CCM, , plusieurs taches sont observées sous la lampe UV ,alors que Aucune tache n'a pu être observée dans le cas de HE2.

mais nous n'avons pas l'extrait standard pour comparaison les Rf , Donc on a utilisé Anisaldehyde comme révélateur :

La Couleur rose indique la présence de  $\alpha$ -Pinène pour H3 et HE1

La Couleur violette ou villette brun indique la présence  $\beta$ -terpineol .pour H3

Cette technique est relativement simple à effectuée cependant dans le cas des huiles essentielles, elle n'a pas donne des résultats concluantes c'est pour cela en a recoure a la CPG

## 6- La CG/SM

Dans notre étude nous avons analysé les huiles essentielles des quatre échantillons par chromatographies en phases gazeuses couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Le couplage CG/SM permet non seulement de tracer les profils chromatographiques, mais aussi grâce à sa très grande sensibilité, a fin d'identifier la majorité des composés présents. L'intérêt de la CG/SM, c'est que pour chaque temps de rétention on a plusieurs spectres de masse possibles ; donc plusieurs produits possibles, avec pour chaque produit la probabilité de sa présence dans l'huile essentielle.

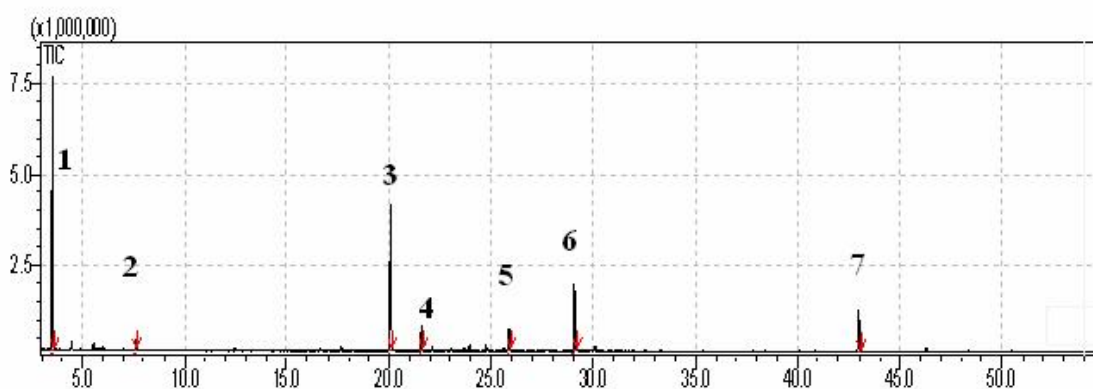


Figure 1 29 Chromatogramme de HE<sup>1</sup> 1 obtenu par CG/SM

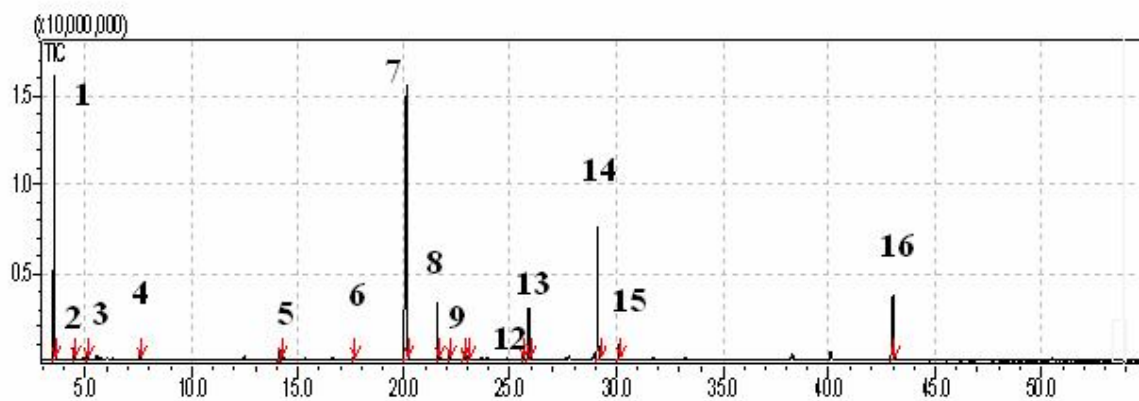


Figure 1 30: Chromatogramme de HE<sup>1</sup> 2 obtenu par CG/SM

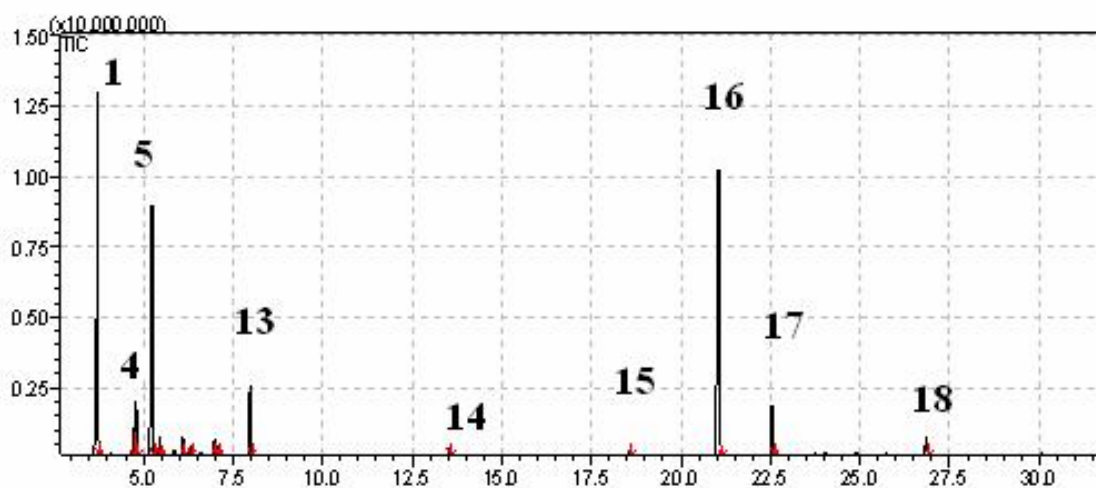


Figure 1 31: Chromatogramme de HE<sup>1</sup> 3 obtenu par CG/SM

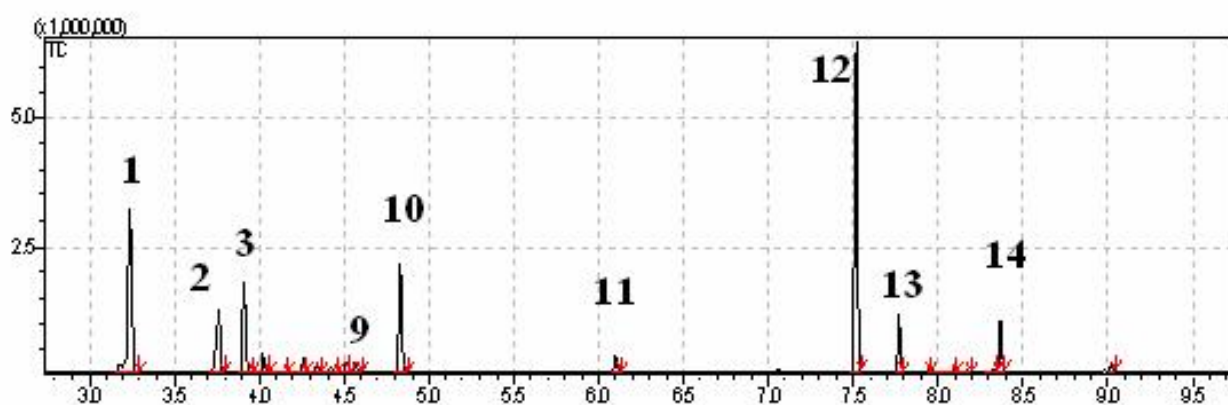


Figure 1 32 : Chromatogramme de HE<sup>1</sup> 4 obtenu par CG/SM

#### 6-1 Constituants chimiques des huiles essentielles étudiées

Après obtention des chromatogrammes des différentes huiles essentielles, nous avons interrogé, pour chaque pic, la banque de donnée (NIST27LIB) afin d'identifier le composé correspondant d'intérêt de la CG/SM, c'est que pour chaque temps de rétention on a plusieurs spectres dans l'huile essentielle.

En plus de l'étude qualitative on a réalisé une étude quantitative pour la détermination du pourcentage de chaque constituant.

4-4-1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus maritima* de Hadada

Les résultats de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus maritima* de Hadada sont répertoriés dans le tableau suivant

Tableau <sup>1</sup> 10: Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus maritima* de Hadada (HE <sup>1</sup> 1)

<sup>1</sup> de pic	Tr	Noms des composés	%
1	3,528	<i>α</i> -pinène	40,31
2	7,589	<i>β</i> -pinène	1,80
3	20,072	<i>β</i> -caryophyllène	28,54
4	21,576	Copaène	4,42
5	25,855	Phenylethylisovalerate	3,65
6	29,090	Caryophyllène oxyde	13,42
7	42,979	Abietatriène	7,86

L'analyse de l'huile essentielle de *Pinus maritima* de Hadada par CG/SM nous a permis d'identifier sept constituants chimiques. Les constituants majoritaires sont :

Le *α*-pinène (40,31%), le *β*-caryophyllène (28,54%), et caryophyllène oxyde (13,42%) accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement faibles

Abietatriène (7,86%), Copaène(4,42%), Phenethyl isovalerate(3,65%) et *β*-pinène (1,80 %).

6--2Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus maritima* de Tonga

Les constituants chimiques identifiés de l'huile essentielle de cette espèce sont 16, elle est constituée essentiellement par :

Le *β*-caryophyllène (35,99%), le *α*-pinène (20,63%), le *α*-Bulnesène (15,93%) et le Abietatriène (8,17%)

On constate aussi la présence de Phenethyl 2-methylbutyrate (5,30%), *α*-caryophyllène (5,84%), copaène (1,34%)

Les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle des feuilles sont regroupés dans le tableau ci-dessous

Tableau 1 11: Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus maritima* de Tonga (HE  
1 2)

1 de pic	Tr	Noms des composés	% des composés
1	3,533	$\alpha$ pinène	20,63
2	4,464	$\beta$ pinène	0,81
3	5,107	4- carène	0,39
4	7,596	2-Decenal, (E)-	0,45
5	14,158	isoleène	0,68
6	17,642	Copaène	1,34
7	20,118	$\alpha$ caryophyllène	35,99
8	21,584	$\beta$ caryophyllène	5,84
9	22,123	cis lanceol	0,89
10	22,791	$\alpha$ cubibène	0,62
11	23,047	$\alpha$ murolène	0,63
12	25,590	Phenylethylisovalerate	0,71
13	25,865	Phenethyl 2-methylbutyrate	5,30
14	29,119	$\alpha$ -Bulnesène	15,93
15	30,098	Caryophyllène oxide	1,62
16	43,001	Abietatriène	8,17

6-3Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill de l'Embouchure lac Mellah

Les constituants chimiques de l'huile essentielle de cette espèce identifiés sont 18 et elle est composée principalement par :

Le  $\alpha$ caryophyllène (31,892%), le  $\alpha$  pinène (24,41%) et le  $\beta$ -carène(19,384%).

Accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement faibles  $\alpha$ terpinolène(5,27%) ,  $\beta$ caryophyllène (4,76%),  $\alpha$  myrcène (3,418 %), et sabinène (2,1315%)

Les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Pinus halepensis* Mill de l'Embouchure lac Mellah sont regroupés dans le tableau ci-dessous

Tableau 1 12 Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill de l'Embouchure lac Mellah (HE<sup>1</sup> 3)

1	Tr	Nom des composés	%
01	3,716	$\alpha$ - pinène	24,41
02	4,1	$\beta$ - pinène	0,2413
03	4,74	Sabinène	2,1315
04	4 ,79	$\beta$ -myrcène	3,418
05	5 ,237	Ä3-carene	19,38
06	5,449	4-terpinyl acetate	1,327
07	5,853	Limonène	0,402
08	6,095	$\beta$ -phelandrène	1,347
09	6,309	ocimène	0,664
10	6,602	$\alpha$ -terpinène	0,342
11	6,979	$\beta$ -6ocimène	1,126
12	7,073	Cyclofenchène	0,6837
13	7,974	$\alpha$ -terpinolène	5,27
14	13,532	Terpinène 4-ol	0,563
15	18,563	$\alpha$ cubibène	0,463
16	21,062	$\beta$ -caryophyllène	31,892
17	22,547	$\alpha$ - caryophyllène	4,76
18	26,844	Phenylethylisovalerate	1,61

6-4Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* de Zarouria

Le tableau 1 13 donne la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Pinus halepensis* de zarouria

Tableau <sup>1</sup> 13 Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Pinus halepensis* de zarouria (HE<sup>1</sup> 4).

<sup>1</sup>	Tr ( Secondes )	Nom des composés	%
01	3,236	$\alpha$ -pinène	21,79
02	3.759	Sabinène	8.51
03	3,915	$\beta$ -myrcène	9,65
04	4,027	$\beta$ -carene	2,26
05	4,173	$\alpha$ -terpinène	0,59
06	4,259	Limonène	1,65
07	4,341	$\alpha$ -phelandrène	0,98
08	4,514	Ocimène	1,32
09	4,567	$\beta$ -terpinène	1,05
10	4,833	$\alpha$ -terpinolène	9,78
11	6,1	Terpinène 4-ol	1,32
12	7,515	Aromadendrène	32,3
13	7,768	$\alpha$ -caryophyllène	4,86
14	9,016	Phenylethylisovalerate	4,04

Analyse chromatographique de l'extrait d'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill de zarouria faite à partir des chromaogrammes obtenus à receler les présences de Quatorze composés identifiés. Les composés majoritaires obtenus dans l'huile essentielle étudiée sont:

l' $\alpha$ -pinène (21,79%), Aromadendrène (32, %). Ensemble, de ces deux composés constituent plus la moitié de la composition totale d' huile essentielle.

Cependant, d'autres constituants présents en quantités moins importantes ont été identifiés, à savoir le  $\beta$  myrcène (9,65 %), le sabinène (8,51 %), le  $\alpha$ caryophyllène (4,86%) et Phenylethylisovalerate(4,4%).

6-5Comparaison de la composition chimique des huiles essentielles étudiées

Le tableau <sup>1</sup> 14 donne les compositions chimiques des huiles essentielles de *Pinus maritima* de la forêt de Hadada (HE<sup>1</sup> 1) et Tonga (HE<sup>1</sup> 2) et *Pinus halepensis* mill de la forêt de l'Embouchure lac Mellah (HE<sup>1</sup> 3) et Zarouria (HE<sup>1</sup> 4)

Tableau 1 14 : pourcentage des composés identifiés dans deux espèces du genre *Pinus* et de deux provenances

Noms des composés	HE <sup>1</sup> 1	HE <sup>1</sup> 2	HE <sup>1</sup> 3	HE <sup>1</sup> 4
$\alpha$ -pinène	40,31	20,63	24,41	21,79
$\beta$ -pinène	1,80	0,81	0,2413	-
$\alpha$ -caryophyllène	28,54	35,99	31,89	-
Copaène	4,42	1,34		
Phenethyl isovalerate	3,65	0,74	1,61	4,04
Caryophyllène oxide	13,42	1,62	-	-
Abietatriène	7,86	8,17	-	-
4- carène	-	0,39	-	-
2-Decenal, (E)-	-	0,45	-	-
isolepène	-	0,68	-	-
$\beta$ -caryophyllène	-	5,84	4,72	4,86
<i>Cis</i> lanceol	-	0,89	-	-
$\alpha$ -cubibène	-	0,62	0,463	-
$\alpha$ -muurolène	-	0,63	-	-
Phenethyl 2-methylbutyrate	-	5,30	-	-
$\alpha$ -Bulnesene	-	15,93	-	-
Sabinène	-	-	2,1315	8,51
$\alpha$ -Myrcène	-	-	3,418	9,65
$\beta$ -carene	-	-	19,384	2,26
$\alpha$ -terpinène	-	-	-	0,59
limonène	-	-	0,402	1,65
$\beta$ -phelandrène	-	-	1,347	0,98
Ocimène	-	-	0,664	1,32
$\beta$ -terpinène	-	-	1,126	1,05
$\alpha$ -terpinolène	-	-	5,26	9,78
Terpinène 4-ol	-	-	0,56	1,32
Aromadendrène	-	-	-	32,3
Cyclofenchène	-	-	0,683	-
4-terpinyl acetate	-	-	1,327	-

- Les huiles essentielles non pas la même composition chimique, On note une différence de la composition relativement importante, d'une part dans les deux espèces (*Pinus maritima*, *Pinus halepensis*), et d'autre part dans les deux provenances. En effet, les composés majoritaires d'huile essentielle de *Pinus maritima* provenant de Hadada (HE<sup>1</sup> 1) sont : le  $\alpha$ -pinène(40,31%), le  $\alpha$ -caryophyllène(28,54%), et le Caryophyllène oxyde(13,42%). Alors que dans huile essentielle de Tonga (HE<sup>1</sup> 2) on trouve : le  $\beta$ -caryophyllène(35,99%), le  $\alpha$ -pinène(20,63%), le  $\alpha$ -Bulnesene(15,93%) et ces deux compositions sont différentes à la

composition chimique *Pinus maritima* de Sidi fradj dont les composés majoritaires sont  $\alpha$ -caryophyllène (26.6%), allo-aromadendrene (12.5%), and  $\alpha$ -humulene (4.3%). (Dob et al,2005).

- On remarque également que huile essentielle de *Pinus halepensis* de l'Embouchure lac Mellah est constitués principalement de :  $\alpha$ -caryophyllène(31,89%)-  $\alpha$ -pinène(24,41%)-  $\beta$ -carene(19,38%). Alors que celle de Zarouria est composé principalement de : Aromadendrène(32,3%)-  $\alpha$ -pinène(21,79%)-  $\alpha$ -terpinolène(9,78%).
- Les études réalisées sur *Pinus halepensis* cueillies de Sidi fradj dont les composés majoritaires sont  $\alpha$ -caryophyllène (26.6%), allo-aromadendrene (12.5%), and  $\alpha$ -humulene (4.3%). (Dob et al,2002).

Globalement, les huiles essentielles étudiées peuvent être répartie en Cinq classes de composés terpéniques : voir figure

A partir des résultats obtenus on a pu constater la présence

- Des monoterpènes hydrocarbures est importante de la composition chimique des huiles essentielles de *P. halepensis* provenant de (l'embouchure lac Mellah et Zarouria) qui représentent un taux respectivement (59,07%et 57,58%) et cette composition et globalement similaire à celle de Tissimsil et Djelfa (Tazerouti et al ,1993), alors que ceux issue de *Pinus maritima* provenant de Hadada et Tonga forment des taux relativement moins respectivement (42.11%,21.83%).
- Quant aux sesquiterpènes hydrocarbures sont présent en grandes quantités de la composition chimique de l' huiles essentielle de *Pinus maritima* de avec un taux de( 61,03% )par apport à celle de Hadada (32.96%).alors que chez *Pinus halepensis* Mill provenant de (l'Embouchure lac Mellah et Zarouria) forment un taux respectivement de(37,07%,37,16%)
- Les monoterpènes oxygénés ne sont present que dans la composition chimique l'huile essentielle de *Pinus maritima* de Tonga (HE<sup>1</sup> 2) et *Pinus halepensis* Mill provenant de (l'Embouchure lac Mellah ) avec des taux respectivement de (0,45%,et0,56%)
- Les diterpènes oxygénés , on les trouvent seulement dans la composition chimique d'huile essentielle de *Pinus maritima* cueillie de Tonga et Hadada avec des taux respectivement de (7.87%,8.17%).

- Présence des Autres groupements chimiques dans l'huile essentielle de *Pinus maritima* cueillie de Tonga et Hadada avec des taux respectivement de (3,65%,6,04%) alors que chez *Pinus halepensis Mill* provenant de (l'Embouchure lac Mellah et Zarouria) forment un taux respectivement de(2,93%,4,04%).

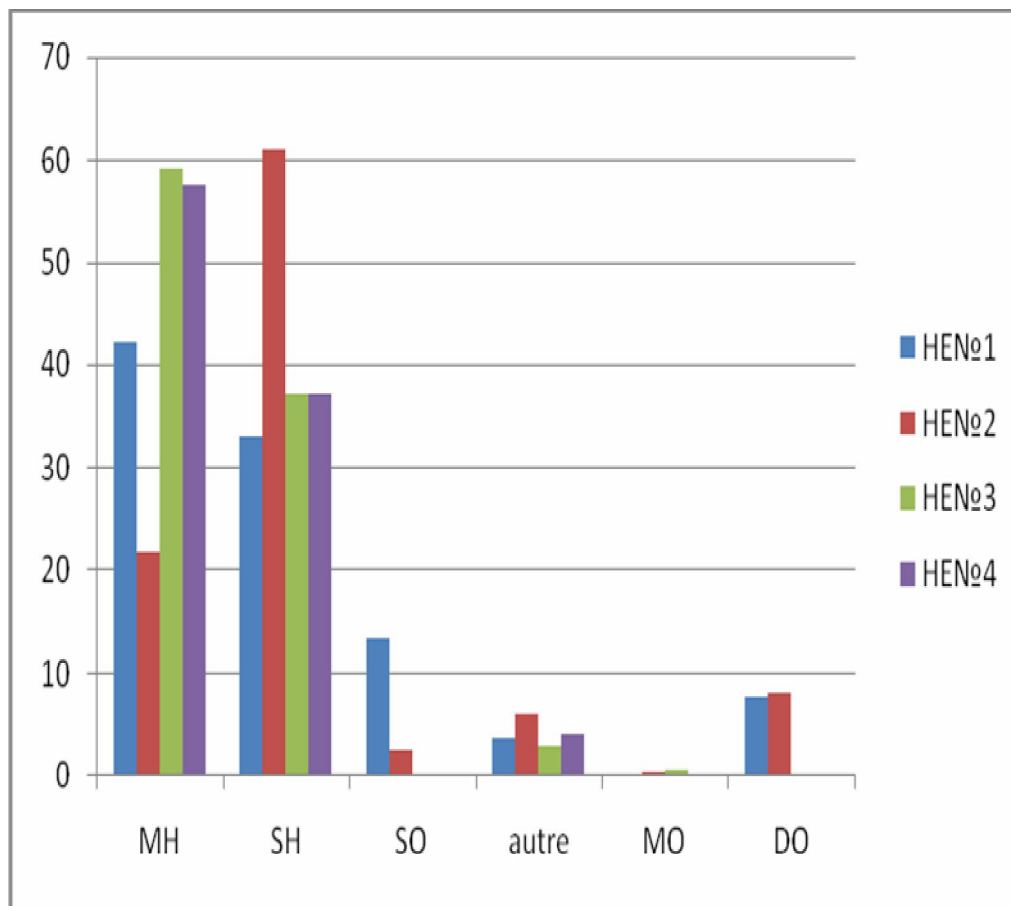


Figure 1 33 : Classification chimique des huiles essentielles étudiées



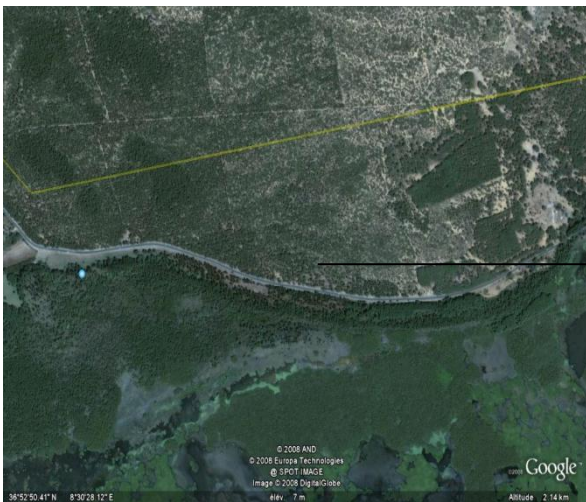
2-1- La Forêt de Hadada :

La zone de Hadada est situé au Nort Est du chef lieu de la commune de souarekh à proximité du C .W.37. Frontière avec la Tunisie ; au sud elle est limitée par la commune d'el Aioun et Ramel Souk , à l'Ouest par la commune d'El kala et à l'est par la frontière Algéro-tunisienne.

Superficie de la forêt 772ha

Sol : sableneux, limoneux, argileux. Orientation : Ouest .





La Forêt de l'embouchure du lac Mellah

Elle est situé dans la rive Ouest du l'embouchure du lac Mellah limité a l'ouest par le Cap rosa et au Sud village du Cap rosa a l'Est lac Mellah .

Sol : sableneux. Orientation :Est



2-4-La Forêt de Zarouria



La station da Zarouria se localise dans la wilaya de Souk Ahras à l'est de la route national N16 (voir figure 1 19)Sol : calcimagnétique , riche en calcaire

Altitudes 680m

Orientation : Nord

Toutes les espèces étudiées sont des peuplements à l'état naturel sauf, les pinèdes de Tonga qui sont des reboisements.

Méthode d'Echantillonnage

Nous avons choisis "l'échantillonnage au hasard" qui consiste à prélever au hasard de diverses localisations les échantillons à étudier. (Bourkhiss et al ,2007).

Pour chaque espèce nous avons procédé à la cueillette des feuilles jeunes, qui se situent donc, dans le dernier segment des rameaux inférieurs des différents pieds de Pinus :

- *Pinus halepensis mill* , provenant de la forêt de l'Embouchure au (P.N.E.K) et de la forêt de Zarouria (Souk Ahras ).
- *Pinus maritima*, provenant de la forêt de Tonga et Hadada au (P.N.E.K).

La cueillette a été réalisée tôt le matin, au moment de la floraison entre mars –avril 2007, par temps sec pour éviter toutes altérations des HE. Les feuilles ou aiguilles sont séchées au laboratoire dans un endroit aéré et propre à l'abri de la lumière.

## 1-étude ethnobotanique

### FICHE ENQUETE

#### 2 Tests phytochimiques préliminaires des feuilles de *Pinus maritima* et *Pinus halepensis* :

##### Test des alcaloïdes :

1 g de la plante séchée et broyée sont mélangés avec 10ml d'HCl à 5% dans un récipient.

Après une demi heure de macération, on filtre le mélange, on additionne au filtrat quelques gouttes de réactifs de Mayer l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence d'alcaloïde. (Grenand, 2004)

##### Test des saponosides :

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse dégréé de dilution d'un détecté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Deux grammes de matériel végétal sec broyé à tester sont utilisés pour préparer une décoction avec 100 ml d'eau distillée .On porte à ébullition pendant 30min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tube (1.3cm de diamètre interne) avec de 1, 2,...10ml, le volume final étant réajuste à 10ml avec de l'eau distillée .

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes .Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le X<sup>e</sup> tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante : I=hauteur de la mousse persistante en cm dans le X<sup>e</sup> tube(Dohou et ,2003)

##### Test des Flavonoïdes :

10g de drogue pulvérisée sont macérés dans 150ml à 1% d'HCl pendant 24 heures.

Après avoir filtré le mélange, on procède au test suivant :

On prend 10ml du filtrat, on le rend basique par l'ajout du NH<sub>4</sub>OH, après trois heures, l'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube à essai indique la présence des Flavonoïdes.

##### Test des tanins :

10g de poudre sèche, sont placés dans 100 ml de MeOH à 80% .Après 15 minutes d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes .L'ajout de gouttes d'une solution de FeCl<sub>3</sub> à 1% permet de

détecter la présence ou non de tanins .La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtres en présence de tanins catéchiques (Dohou et ,2003)

Test des cardénolides :

1g de poudre sèche est macéré dans 20ml d'eau distillée pendant 3 heures, après filtration, on prélève 10ml de filtrat et on l'extrait avec un mélange de 10ml de  $\text{CHCl}_3$  et de  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ .

On évapore, la phase organique dans un bain de sable T  $90^\circ$ , puis on dissout le précipité dans 3ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial, en ajoutant quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  et 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré sur les parois du tube à essai. L'apparition d'une couleur vert-bleu dans la phase acide indique la présence des cardénolides.

Test stérols et terpènes :

5g de poudre séchée (échantillon), sont dissous dans 20ml d'éther de pétrole, filtrés, puis évaporés. Le résidu obtenu est dissout dans 0,5ml d'acide acétique auquel on ajoute 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. Dans la zone de contact entre les deux liquides, il se forme un cercle violet ou marron, lorsqu'il devient gris, ceci indique la présence des stérols et terpènes.

6 le taux d'humidité :

Mode opératoire :

Peser un échantillon de 10 g(à 0.01 g près ) (p1)

Placer l'échantillon dans une étuve à  $70^\circ\text{C}$ . Sécher jusqu'à poids constant (24 h )

Laisser refroidir 30min au dessiccateur peser avec une précision de 0,01g près (p2)

6-3Calcul du taux d'humidité

$$\text{D'humidité (\%)} = \left( \frac{p1-p2}{p2} \right) \times 100$$

P1 poids frais

P2 poids sèches (Kalra et al,1992)

## EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

Les huiles essentielles ont été isolées par hydrodistillation en utilisant l'appareil figurant dans la 5<sup>ème</sup> édition de la Pharmacopée européenne. Qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans de l'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité.



APPAREIL HYDRODISTILLATION

8-Analyse quantitative et qualitative

8-1 Identification par CCM

1-Mélanger 1ml HE à examiner avec du toluène et compléter à 10 ml avec le même

2-support (phase stationnaire) : kieselgel GF<sub>254</sub>

3-Eluant (phase mobile) : ACETATE d'éthyle, toluène (5 :95), séchage intermédiaire 5 min, température ambiante.

4-Développement sur un parcours de 15 cm

5- Détection UV<sub>254</sub>

5-solution à analyser

6-On dépose 10µl.

7-Pulvériser avec une solution d'aldehyde anique et chauffer à 100-105°C pendant 5 à 10 mn puis examiné a la lumière du jour pour la révélation :

La Couleur rose indique la présence de  $\alpha$ -Pinène

La Couleur gris rose indique la présence de Linalol

La Couleur violette ou villette brun indique la présence  $\alpha$ -terpineol (Pharmacopée européenne, 2005)

8-2-La Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

La composition chimique des huiles a été déterminée par la technique de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée avec la Spectrométrie de Masse (CG/MS) sous les conditions opératoires suivantes :

- L'analyse quantitative a été effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de marque couplée au spectromètre de masse de type Shimadza équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et muni d'une colonne capillaire en silice fondue de type QP2010C25 FS-OV1701 de 25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne et 0,25µm d'épaisseur de film.

La température de la colonne est programmée de 60 à 220 °C à raison de 3°C/min.

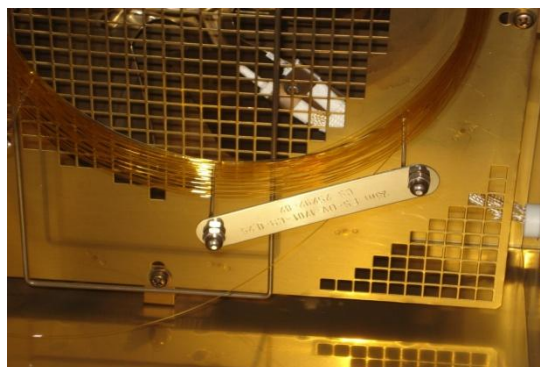
La température de l'injecteur est fixée à 240 °C et celle de détecteur (FID) à 250 °C.

Le débit de gaz vecteur (Helium) est fixé à 1.5ml/min.

Le volume de l'échantillon injecté est 0,1 µl de l'huile pure diluée à 10% dans l'hexane.

Le pourcentage de chaque composé au sein de l'huile est déterminé à partir des aires des pics sans tenir compte des facteurs de correction en supposant que tous les constituants ont des coefficients de reponse voisines. (Stenhagen *al*, 1976)

- L'identification des constituants (hélium) est fixée à 20 psi. Le volume injecté de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention sur la colonne (calculés par rapport aux temps de rétention d'une série d'alcane linéaires (C9-C28)) avec ceux de produits de référence et par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une bibliothèque commerciale (ov.17/GCMS Real time analysis).,(Tsitsimpikou ,2001)



9- Evaluation de l'activité bactéricide des huiles essentielles (aromatogramme)

A fin d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de pin extraites, un aromatoigramme à été réalisé sur des souches bactériennes Selon la méthodes NCCLS(national committee of control laboratory standard)

Aromatoigramme a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie à USM d'Annaba

Souches

Les souches bactériennes proviennent du laboratoire de microbiologie au niveau du CHU/Dorban de Annaba

Ø Souche de *Staphylococcus aureus*

Ø Souche de *Pseudomonas aeruginosa*

Ø *Escherichia coli*

Préparations des suspensions

Pour chacun une des souches bactériennes qui ont été repiquée sur gélose nutritive (obtention de souches juvéniles) et entretenue dans une chambre froide.

A l'aide d'un écouvillon , on a prélevé des Colonies bien isolées sur milieu solide sont suspendu dans de l'eau physiologique stérile donnant  $10^6$  a  $10^8$  CFU/ml qui correspond a un standard a 0,5farlandpuis bien agiter

Ensemencement

Il s'agit du milieu de MH (Mueller –Hilton ) préalablement fondue et refroidi à 45°C'est coulé sur des boites de Pétri de 90mm Ô

A l'aide d'un écouvillon stérile en introduit celui ci dans la suspension puis essorer au port puis ensemencez les milieux des boites de Petrie

A l'aide d'écouvillon stérile, on réalise des stries serrées en effectuant 3 rotations de 60°( Berredjem,2000)

Application des disques

A l'aide d'une pince stérile on a déposé des disques de papier buvard (préalablement découpés à l'aide d'un perforateur et stérilisés a l'autoclave) de 6 mm de diamètre. Apres avoir imprégner les disques dans l'huile essentielle en place dans les boites de Pétrie, on respecte l'espace entre les disques

Incubation

Incubation des boîtes de Petri dans incubateur à une température de 37°C pendant 24h à 48h

( Vincent, 1991)

Lecture

Mesure le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse mm Ô

## HISTOLOGIE

L'utilisation différentielle de colorants plus ou moins spécifiques, agissant sur les parois ou le contenu cellulaire, facilite l'observation et la reconnaissance des tissus dans un organe.

La double coloration d'anatomie les plus intéressantes s'opposent. On utilise le rouge Congo /vert d'iode

La Couleur des Celluloses et pectines en Rose à rouge

La Couleur des lignines et Subérines en Vert à bleu

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Ethnobotanique

Notre enquête ethnobotanique sur le genre Pinus a été réalisée suite à la confection d'une fiche technique, qui nous a permis de questionner l'âge, le sexe, la connaissance de la plante, son utilisation et ses propriétés thérapeutiques.

Nous avons approché la population des deux wilayas en l'occurrence Annaba et El Taref.

Les résultats de l'enquête sont regroupés selon les tableaux suivants :

1-1 Classification selon L'âge

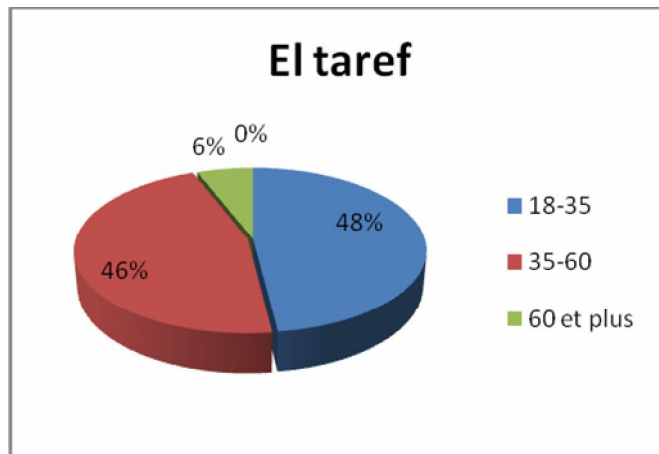
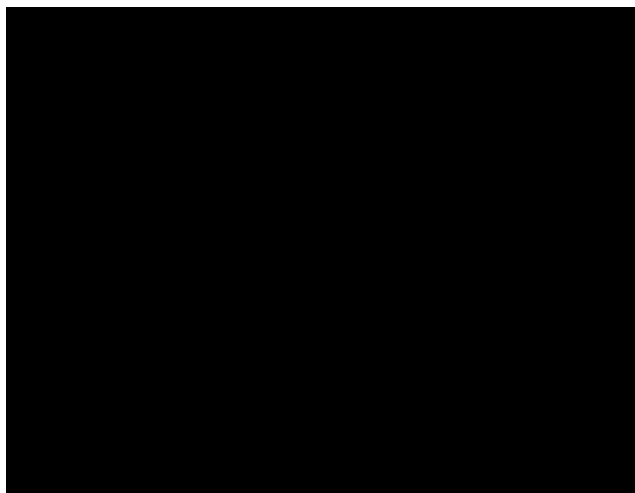
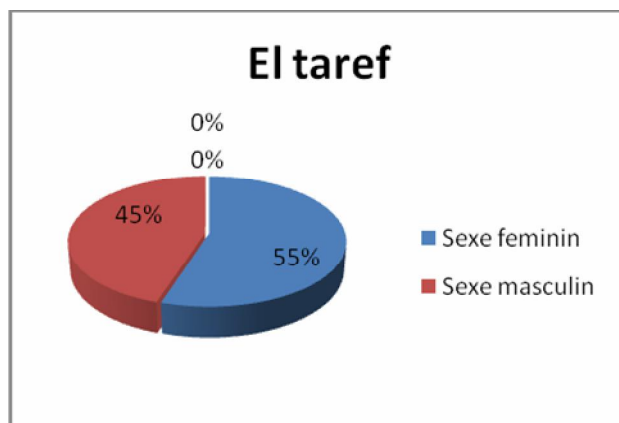
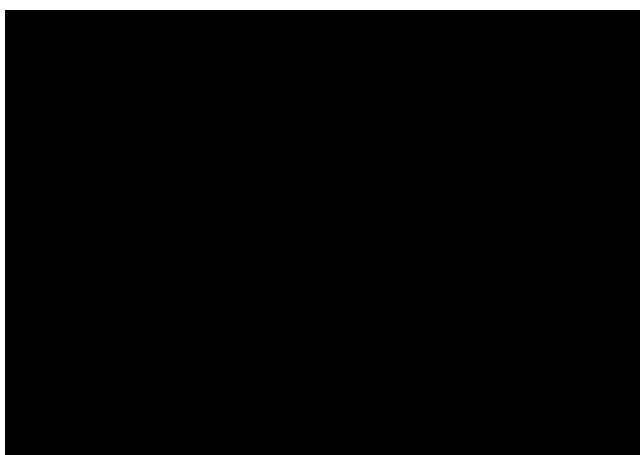


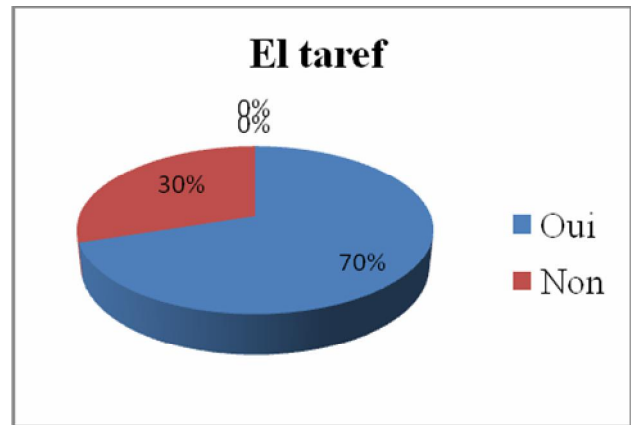
Figure 1 22: Représentation graphique selon l'âge dans la wilaya d'Annaba et El teref

1-2 Classification selon le sexe

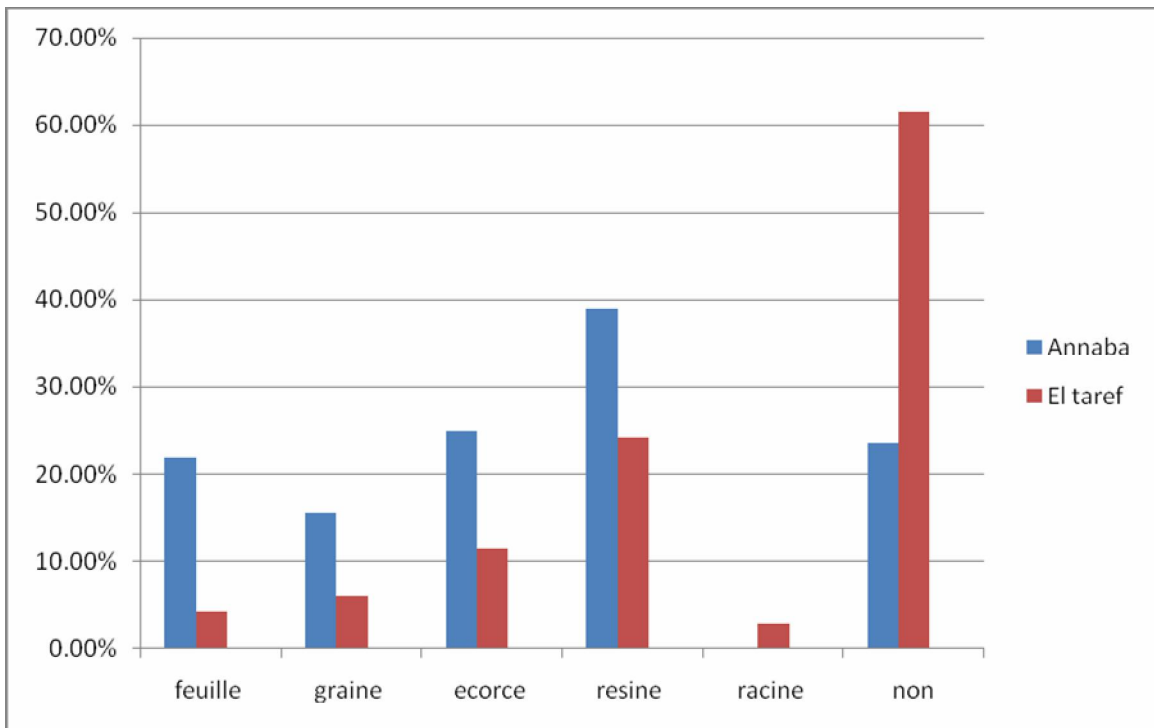


Représentation graphique selon le sexe dans la wilaya d'Annaba et El teref

1-3 Répartition selon Connaissance de Pin



### 1) Classification selon Utilisation et propriété thérapeutique



Représentation graphique selon utilisation thérapeutique

### 1-4-Propriétés et utilisations thérapeutiques

L'écorce :

- La décoction de l'écorce finement broyée et administré contre ulcère d'estomac et la colopathie fonctionnelle.
- Utilisation de l'écorce en poudre comme cataplasme sur les brulures

Les feuilles :

- Les feuilles utilisent en inhalation en cas de grippe ou bien un rhume
- Infusion des feuilles est utilisée en cas de bronchite

- L'eau issue de la décoction des feuilles puis filtrer et utilisé contre les lentes.
- Infuser des feuilles est utilisé également en cataplasme contre les hémorroïdes.

#### Les graines

- Les graines entre dans la préparation des plats culinaires.
- Les graines broyer est utilisée comme emplâtre contre les bronchites et la toux. En cas de rhumatisme aussi
- Comme aphrodisiaque.
- Extrait l'huile pour massage efficace contre rhumatisme.

#### La résine

- La résine chauffer puis additionnées d'huile d'olive et de miel (édulcorant) constitue une préparation efficace pour les maladies respiratoires, asthme, toux.
- La résine chauffer dans de l'eau est administré pour les bébés contre les gaz.

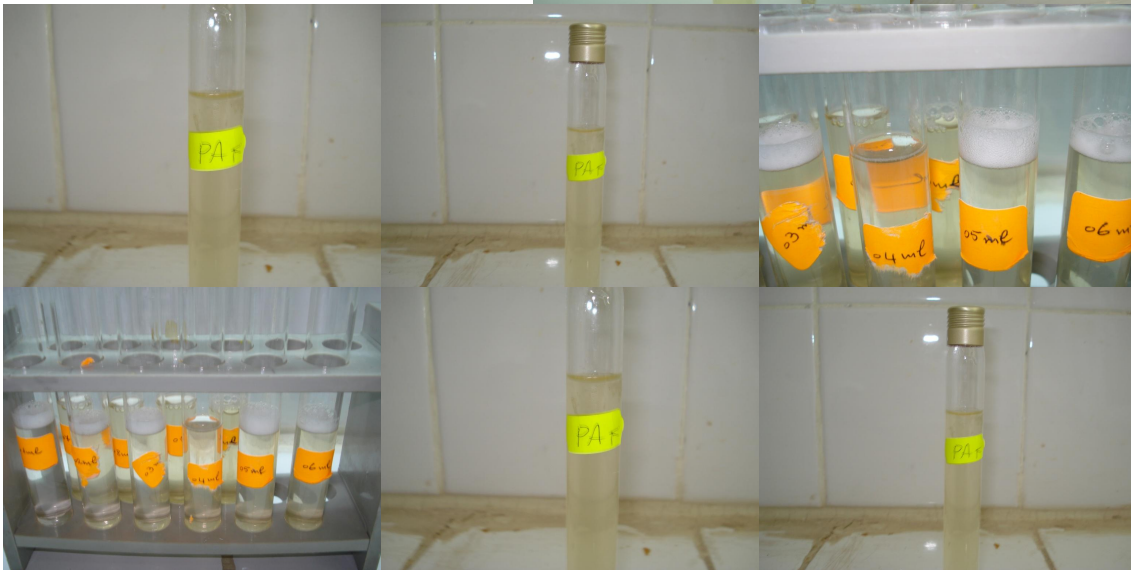
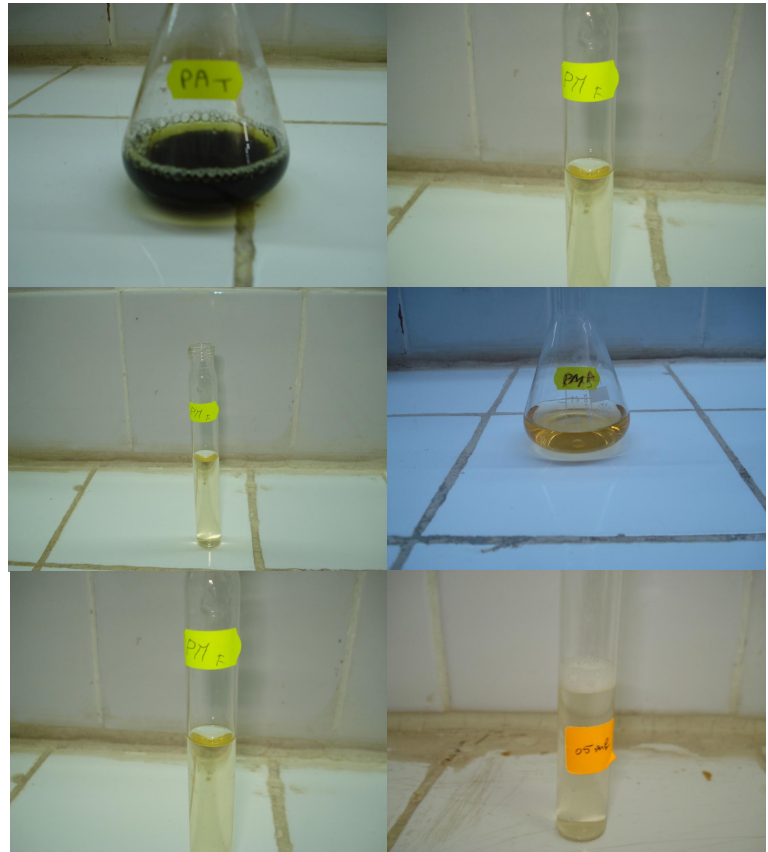
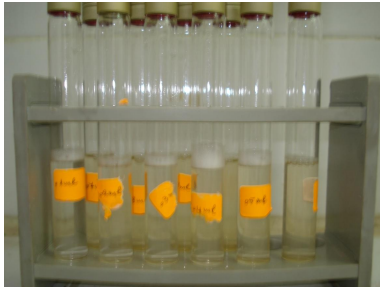
#### La racine :

- Séchées broyer, la décoction et utilisée pour les douleurs d'estomac.

## 2-Résultats des essais phytochimiques préliminaires :

Nous avons recherché dans les feuilles des deux espèces *Pinus maritima* et *Pinus halepensis* les principales classes des métabolismes secondaires, à savoir alcaloïdes, saponines, tanins, et flavonoïdes. Les résultats obtenus des recherches phytochimiques préliminaires sont représentés dans le tableau ci-dessous

Tableau 1 7 : Résultats des analyses phytochimiques préliminaires



Noms des principes actifs	<i>Pinus maritima</i>	<i>Pinus halepensis</i>
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	++	++
Tanins	+++	+++
Sponines	+	++
Terpènes et stérols	++	++
Cardinolides	-	-

Les tests phytochimiques nous ont révélé que :

- ∅ la présence d'une forte teneur en tannins et flavonoïdes pour les deux espèces
- ∅ La présence de terpènes et stérols en quantité moyennement riche dans les deux espèces.
- ∅ Les saponines sont présentes pour les feuilles de *Pinus maritima* en quantité plus ou moins faible avec un indice (I=100) alors que pour les feuilles de *Pinus halepensis* moyennement riche.(I>100)
- ∅ Pour le test des alcaloïdes aucun précipité n'a été observé pour l'extrait des feuilles des deux espèces *P.maritima* et *P halepensis* donc absence des Alcaloïdes
- ∅ Le test n'a pas permis de mettre en évidence l'existence des cardinolides dans les feuilles des deux espèces.

## I -Ethnobotanique

Notre enquête ethnobotanique sur le genre *Pinus* a été réalisée suite à la confection d'une fiche technique, qui nous permis de questionne l'âge, le sexe, la connaissance de la plante, son utilisation et ses propriétés thérapeutiques.

Nous avons approché la population des deux wilayas en l'occurrence Annaba et El teref.

Les résultats de l'enquête sont regroupés selon les tableaux suivants :

## 1-1Classification selon L'âge

Sur un total de 100 personnes interrogées,

-46% appartienne à une tranche d'âge comprise entre 18-75 ans, pour la wilaya de Annaba, elle est 48% pour la wilaya de El teref .

-les sujets âgés de 35à 60 ans est de 38% pour la wilaya d'Annaba

46% dans la wilaya d'El teref.

-16% des sujets dont l'âge et compris 60 ans et plus représente la wilaya de Annaba, il est de 6% à El teref.

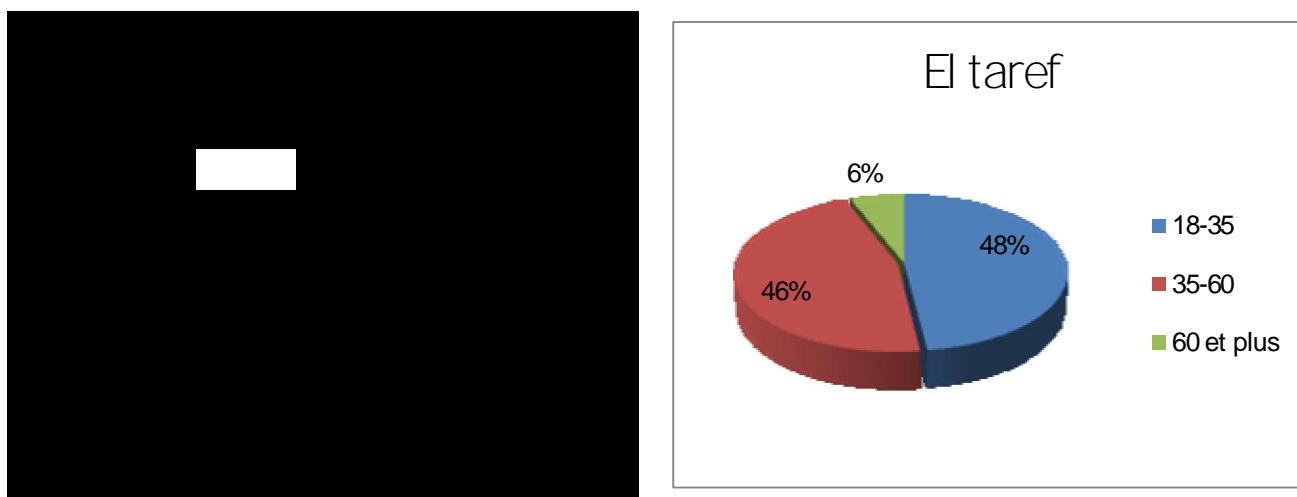


Figure 1 22: Représentation graphique selon l'âge dans la wilaya d'Annaba et El teref

## 1-2 Classification selon le sexe

Le tableau 1 5 montre les résultats obtenus après enquête auprès de la population d'Annaba que le nombre de femmes interrogées est relativement élevé 64% et 55% à El taref . (voir figure 1 23)

Pour ce qui concerne la répartition par sexe masculin, à Annaba 36% et nous avons 45% à El Taref

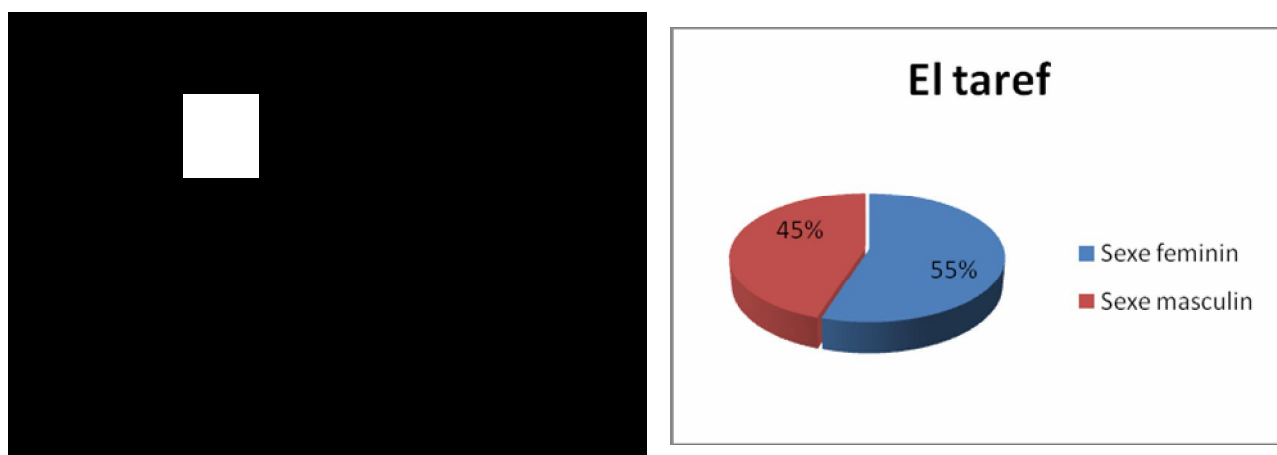


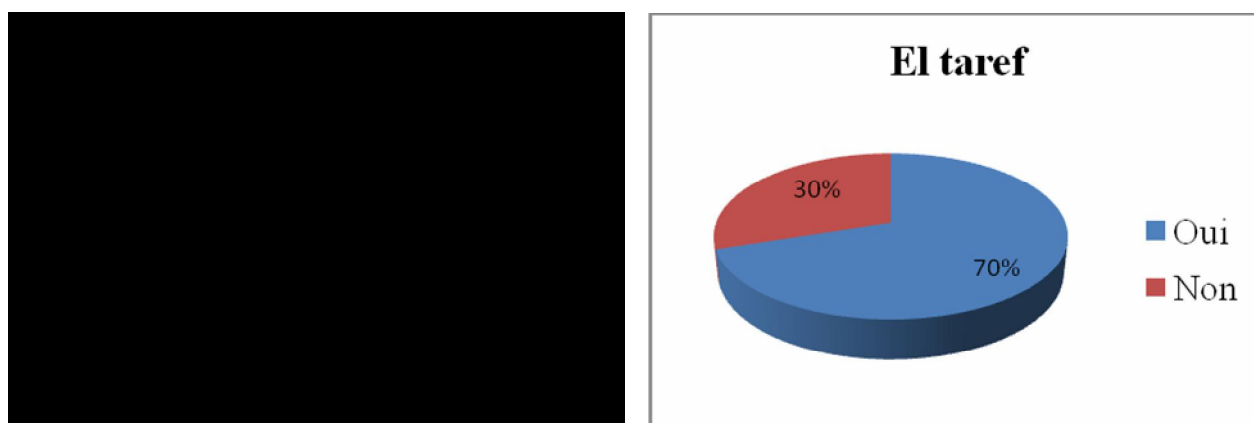
Figure 1 23: Représentation graphique selon le sexe dans la wilaya d'Annaba et El taref

Tableau 1 5: Résultats obtenus pour les paramètres âge et Sexe

		Annaba	Eltaref
Sexe %	Féminin	64	55%
	Masculin	36	45%
Tranche d'âge %	18-40	46%	48%
	40-60	38%	46%
	60 et plus	16%	06%

## 1-3 Répartition selon Connaissance de Pin

D'après la fig<sup>1</sup> 24 nous constatons que les résultats obtenus à Annaba sont en équilibre avec ceux d'El Taref, à savoir 69% (Annaba) et 70% (El Taref) ce qui explique que la population d'Annaba et El Taref connaissent le pin vu que la région est très riche en conifères.



Figure<sup>1</sup> 24: Représentation graphique connaissance le pin.

## 1) Classification selon Utilisation et propriété thérapeutique

Le pourcentage d'utilisation de nos espèces en médecine traditionnelle varie, selon la ville et d'autre selon l'organe du végétale. (voir tab<sup>1</sup> 6, fig<sup>1</sup> 25)

Nous constatons qu'à Annaba une forte population (76.26%) utilise le pin en médecine traditionnelle alors qu'à El Taref le pourcentage baisse à 40%.

L'utilisation diffère selon la partie de la plante voir figure<sup>1</sup> 25

Il s'est avéré que la résine est une substance très utilisée par les habitants des deux wilayas 36% et 24% respectivement, suivie par une utilisation fréquente de l'écorce avec un pourcentage de 23.18% à Annaba tandis que il est de 12.85% El taref.

Le taux d'utilisation des feuilles est de 20.2% alors que il est seulement à 4.28% El Taref, suivie d'une utilisation des graines 14.49% et 8.57 respectivement.

Seulement 2.85% des habitants d'El Taref utilisent les racines

Tableau 1 6: Résultats obtenus selon utilisations thérapeutiques de pin

	Parties utilisées	Annaba	El teref
Utilisation thérapeutique %	Graines	14.49%	8.57
	Feuille	20.28	4.28
	Résine	36.23	24.28
	Ecorce	23.18	12.85
	Racine	-	2.85
	Inconnue	23.73	60

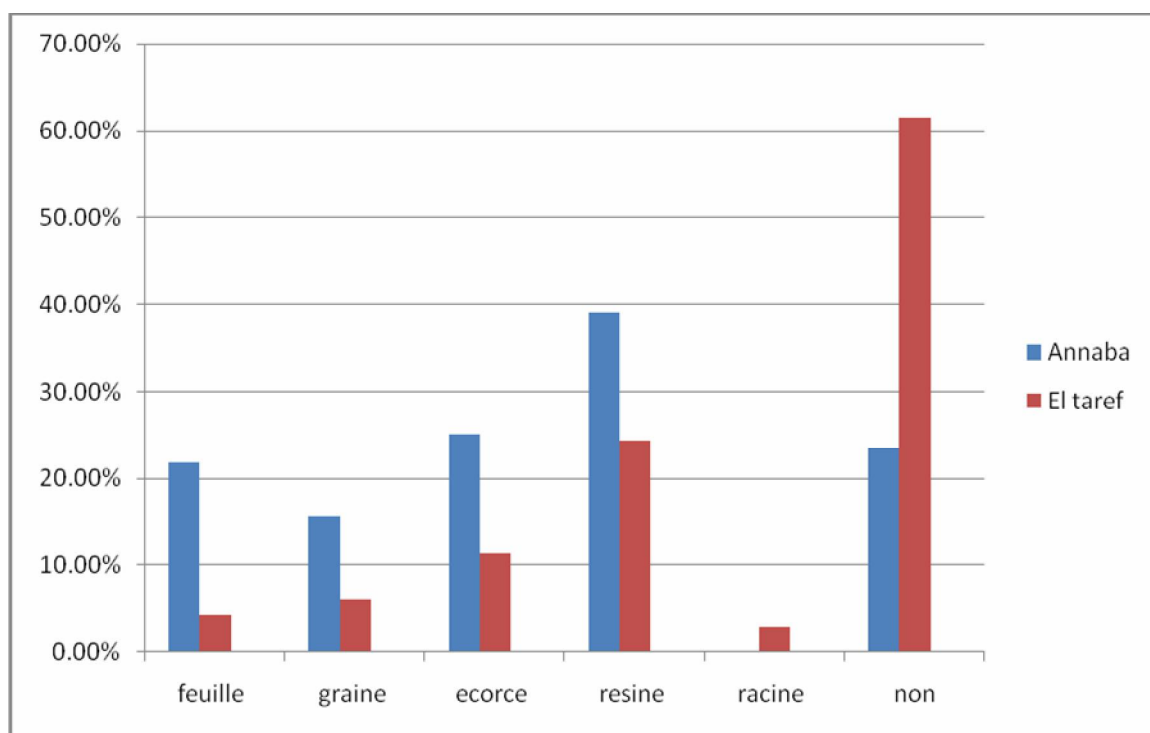


Figure 1 25: Représentation graphique selon utilisation thérapeutique

#### 1-4-Propriétés et utilisations thérapeutiques

L'écorce :

- La décoction de l'écorce finement broyée et administré contre ulcère d'estomac et la colopathie fonctionnelle.
- Utilisation de l'écorce en poudre comme cataplasme sur les brûlures

Les feuilles :

- Les feuilles utilisent en inhalation en cas de grippe ou bien un rhume
- Infusion des feuilles est utilisée en cas de bronchite
- L'eau issue de la décoction des feuilles puis filtrer et utilisé contre les lentes.
- Infuser des feuilles est utilisé également en cataplasme contre les hémorroïdes.

Les graines

- Les graines entre dans la préparation des plats culinaires.
- Les graines broyer est utilisée comme emplâtre contre les bronchites et la toux. En cas de rhumatisme aussi
- Comme aphrodisiaque.
- Extrait l'huile pour massage efficace contre rhumatisme.

La résine

- La résine chauffer puis additionnées d'huile d'olive et de miel (édulcorant) constitue une préparation efficace pour les maladies respiratoires, asthme, toux.
- La résine chauffer dans de l'eau est administré pour les bébés contre les gaz.

La racine :

- Séchées broyer, la décoction et utilisée pour les douleurs d'estomac.

## Aromatogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits des huiles essentielles brutes et séries de dilutions  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$ , par la méthode de diffusion en milieu solide (la méthode des disques)

Les tests ont été réalisés d'une part à partir des extraits bruts et d'autre part par une série des dilutions au  $\frac{1}{2}$  et  $\frac{1}{4}$  dans le DMSO.

Les souches qui ont été sélectionnées pour la réalisation de cette étude proviennent de laboratoire microbiologie CHU Dorban d'Annaba responsables d'affections.

Nous avons utilisé la méthode de diffusion sur milieu solide (MH), en utilisant une série de disques de  $\varnothing$  6mm préalablement autoclavés, et tests à blanc, ces derniers imbibés avec les extraits à tester.

La mesure en millimètres du diamètre des zones d'inhibition des cultures permet d'établir une classification des huiles essentielles testées, selon une échelle de notation symbolique allant de - à +++

(-) HE sans action *in vitro* sur les germes testés lorsque le  $\varnothing < 10$  mm

(+) HE a une action intermédiaire *in vitro* sur les germes testés lorsque le  $10 < \varnothing < 16$  mm

(++) HE a une action importante *in vitro* sur les germes testés lorsque le  $16 < \varnothing < 25$  mm

(+++ ) HE très efficace *in vitro* sur les germes testés lorsque le  $\varnothing > 25$  mm d'après ( Meena et Sethi , 1994), ( Vincent, 1991) et (Jeovetz et al, 2000)

Tableau 1 15: diamètres d'inhibitions (en mm) des souches bactériennes sélectionnées mesurés à partir des aromatogrammes

Huiles essentielles Pinus maritima (site1)	<i>Echerichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PH	7.5	12.4	15.26
PH'	10.43	10.1	11.23
PH''	8.3	7.93	11.2

PH: HE brut PH' : HE dilué à  $\frac{1}{2}$  PH'' : HE dilué à  $\frac{1}{4}$

L'application des disques des huiles essentielles brutes testées a inhibé le développement des différentes bactéries testées avec un intervalle de (7,5 à 15,26) et la meilleure zone d'inhibition 15,26 enregistrées montre une activité meilleure pour les *Staphylococcus aureus*

La dilution  $\frac{1}{2}$  (PH') a donné des diamètres d'inhibitions qui varient de 10,43 à 11,23 et la meilleure zone d'inhibition 11,23 enregistrées montre une activité meilleure pour les *Staphylococcus aureus*

Alors que La dilution  $\frac{1}{4}$  (PH'') à inhiber le développement des différentes bactéries testées avec des diamètres qui varie de 8,3 à 11,2 et la meilleure zone d'inhibition 11,2 enregistrées montre une activité meilleure pour les *Staphylococcus aureus*

L'activité antibactérienne de cette HE est due principalement à son profil chimique, Il est à préciser que notre HE est caractérisé par la présence de  $\alpha$ -pinène (40%) connu pour son effet inhibiteur. En effet une étude réalisée par (Angioni et al, 2003) sur les HE des feuilles de *Juniperus oxycedrus* a montré qu'elle présente une bonne activité vis à vis de *Staphylococcus aureus*, cette huile est caractériser par l'abondance en  $\alpha$ -pinène environ 86%.

Tableau 1 16: diamètres d'inhibitions (en mm) des souches bactériennes sélectionnés mesurés à partir des aromatoigrammes

Huiles essentielles Pinus maritima (site2)	<i>Echerichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PT	8.7	12.3	11.7
PT'	9.3	10.3	12.35
PT''	10.1	9.4	9.3

PT:HE brut PT' : HE dilué à  $\frac{1}{2}$  PT'': HE dilué à  $\frac{1}{4}$

Etude de l'activité bactéricide d'huile essentielle brute (PT) de *Pinus maritima* cueillie de Tonga a donné des diamètres d'inhibition qui varie de 8.7 à 12.35. et la meilleure zone d'inhibition 12,3 enregistrées montre une activité meilleure pour les *Pseudomonas aeruginosa*

La dilution au  $\frac{1}{2}$  d'huile essentielle (PT') a présenté des zones d'inhibition qui varie de 9.3 et 12,35 montre une activité meilleure pour les *Staphylococcus aureus* cependant La dilution au  $\frac{1}{4}$  d'huile essentielle (PT'') avec des valeurs qui varies de 10.1 à 9.3 montre une activité meilleure pour les *Echerichia coli*

La différence entre les zone d'inhibition et peut être explique par le mécanisme d'action de l'huile à la prolifération des bactéries étudiées.

Tableau 1 17 : diamètres d'inhibitions (en mm) des souches bactériennes sélectionnés mesurés à partir des aromatoigrammes

Huiles essentielles Pinus halpensis (site3)	<i>Echerichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PE	8.2	12.2	10.7
PE'	9.2	15.9	12.35
PE''	10.2	14.4	13.6

PE :HE brut PE' : HE dilué à  $\frac{1}{2}$  PE'': HE dilué à  $\frac{1}{4}$

La culture des souches étudiées en présence des différentes disques d'huile essentielle testés à enregistrées des zones d'inhibitions avec des valeurs pour PE qui varie de 8,2à10,7, alors que pour PE' à montrer une activité remarquable avec des diamètres qui varie de 9,2à15,9, et la zone la plus élevée a été observée chez *Pseudomonas aeruginosa* cependant PE' présente des zones d'inhibitions qui varie de 10,2à14,4 est la plus élevée observée chez *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 1 18 : diamètres d'inhibitions (en mm) des souches bactériennes sélectionnés mesurés à partir des aromatogrammes

Huiles essentielles Pinus halpensis (site4)	<i>Echerichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PS	10.6	9.6	13.7
PS'	9.9	9.6	11.23
PS''	10.4	8.6	9.3

Huiles essentielles testés à donner une zone d'inhibition qui varie de 9.6à13.7 et de 9.6-11.3 respectivement PS et PS' alors qu'elle est de 8.6à10.4 pour PS''

- Selon ( Meena et Sethi , 1994) nous avons pu classer nos huiles essentielles comme bactéricide faible, et Nos résultats ne concorde pas avec la littérature dont la classification de huile essentielle de Pin comme bactéricide moyen(Belaiche,1979) .
- La différence des zones d'inhibition est explique par la variation de la composition chimique des différentes huiles essentielles étudiées. ainsi que par les souches et la concentration

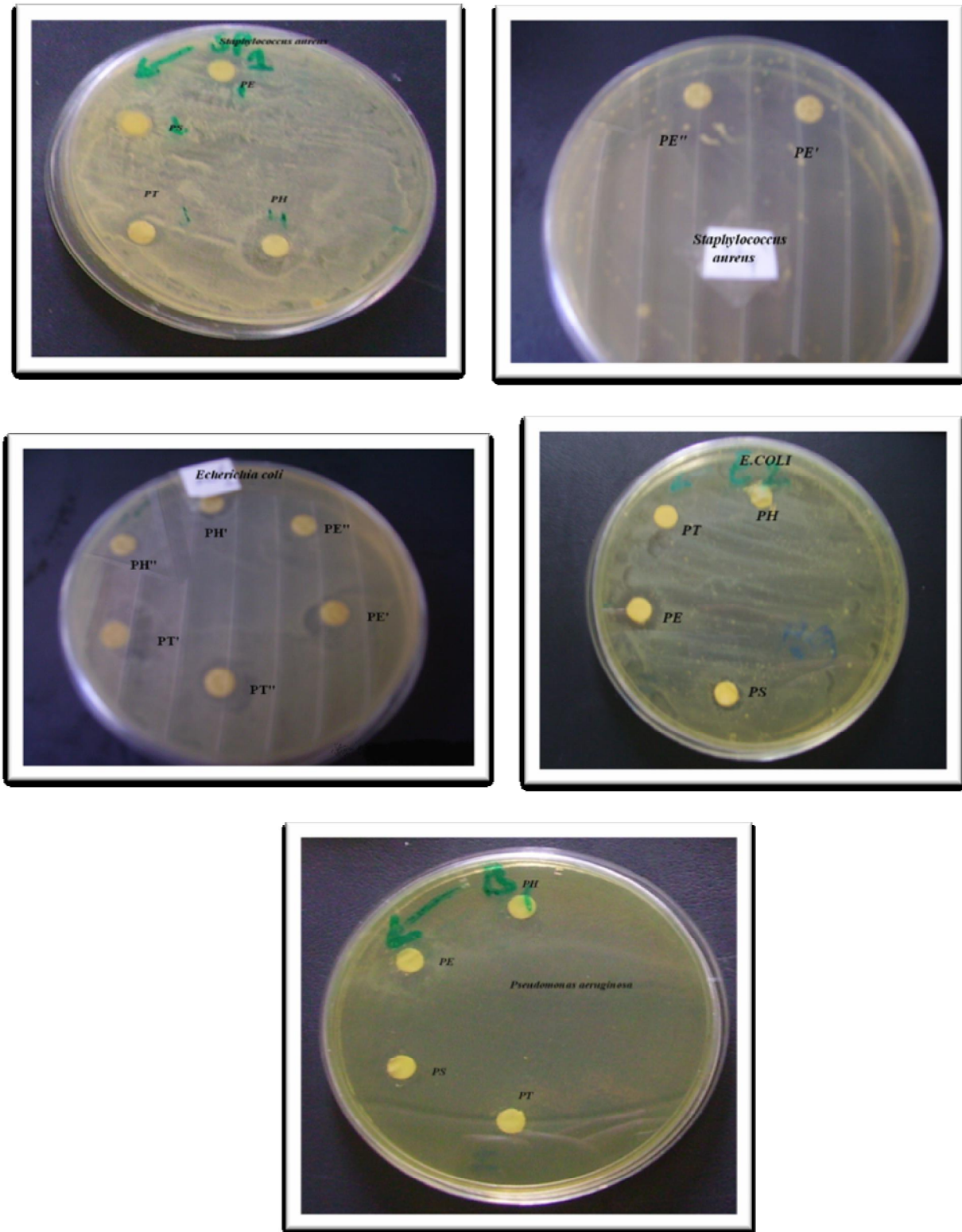


Figure 1 34 : Aromatogrammes sur les germes étudiés



## Coupe histologique

Histologie végétale est la partie de la biologie végétale qui étudie la structure microscopique des tissus végétaux, cette science s'est constituée au XIX<sup>ème</sup> siècle, avec le perfectionnement du microscope, elle s'appuie sur la cytologie qui est l'étude de la cellule vivante (Speranza et al, 2006)

## 1/ la feuille

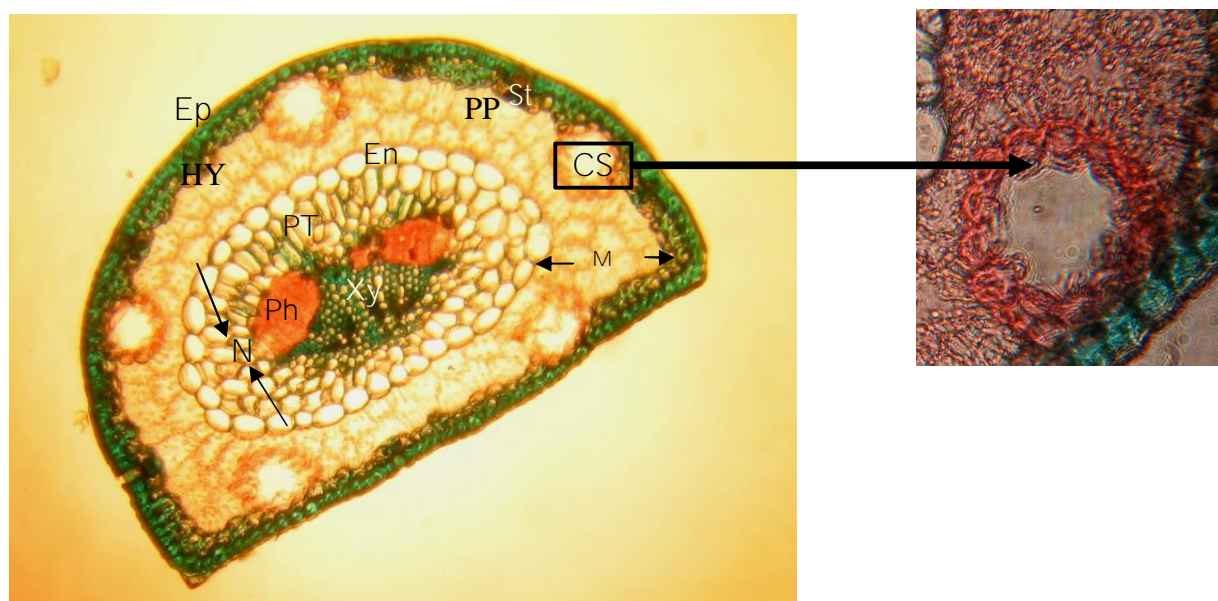


Figure 1 35 : Coupe transversale de feuille *Pinus Halepensis mill* (GX10)

Ep :épiderme, Hy hypoderme St stomates, CS canal sécréteur En endoderme M :Mesophylle  
PP parenchyme plicé PT parenchyme de transfusion Xy Xylème Ph Phloème N :Nervure

La réalisation des coupes au niveau de la feuille de *Pinus Halepensis mill*, en utilisant la technique de la double coloration, puis l'observation au microscope optique Leika DMLS2 incorporé à un appareil photo numérique, nous a permis de distinguer les structures suivantes, de la face supérieure à la face inférieure :

- Un épiderme (Ep) constitué par une assise de cellules jointives qui délimite le limbe, de couleur verte, à cause de la présence de fibres sclérenchymateuses qui lui confère une rigidité. Par ailleurs un hypoderme (HY) constitué de deux assises de cellules dont la composition chimique est en fibres scléreuses. Cet hypoderme joue le rôle de soutien et s'interrompt au niveau des stomates.

- Les stomates (*st*) sont enfoncés dans les tissus épidermiques, on les trouve distribués sur toute la surface foliaire.
- Vers l'intérieur, un parenchyme plissé (PP), ni palissadique, ni lacuneux, car les parois cellulaires ont des épaisissements localisés qui sont à moitié fissurés et semblables à des plis.
- La feuille comprend une seule nervure comme chez tous les conifères (feuilles uninervurées). La nervure est délimitée par une assise de cellules dite endoderme. L'intérieur deux faisceaux collatéraux sont associés dans le sens longitudinal de l'aiguille. Ces derniers sont entourés d'un tissu de transfusion commun. et selon withelm, 1998 il est constitué d'une part, par des cellules tracheidales et d'autre part par des cellules riches en cytoplasmes. Ce tissu assure les échanges d'eau et des substances avec les tissus foliaires environnants.

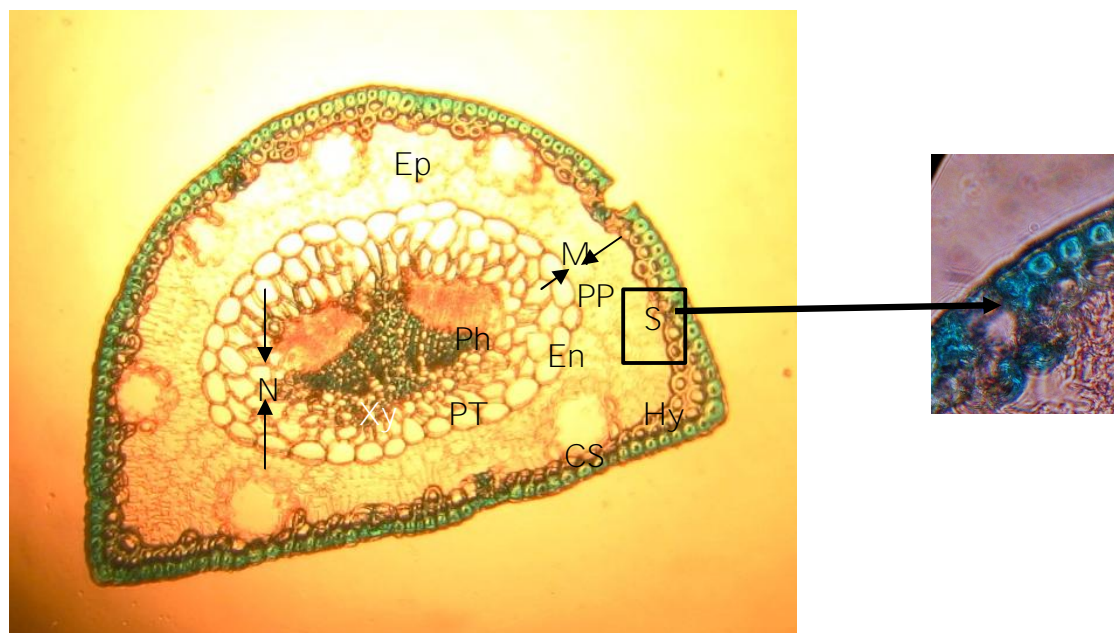


Figure 1 36 : Coupe transversale de feuille *Pinus maritima* GX10

Ep :épiderme, Hy hypoderme St stomates, CS canal sécréteur En endoderme M :Mesophylle  
PP parenchyme plis PT parenchyme de transfusion Xy Xylène Ph Phloème N :Nervure

Nous avons observé de l'extérieur vers l'intérieur les différentes structures caractéristiques de cette espèce: Nous retrouvons le sclérenchyme sous-épidermique (s). Celui-ci vient rigidifier l'aiguille et la protéger. Les stomates sont enfoncés au niveau de l'hypoderme dans des cavités en entonnoirs (voir figure 1 36), ainsi que les parois des cellules épidermiques sont si fortement épaissies qu'il ne subsiste plus qu'une faible lumière, délimité par une cuticule.

L'intérieur de l'aiguille est rempli par le parenchyme qui assure la photosynthèse dit plissé, ce parenchyme est parcouru par des canaux sécréteurs (cs), entouré d'une gaine parenchymateuse.

L'étude de l'anatomie des feuilles de *Pinus halepensis* Mill et *Pinus maritima* nous a permis de déduire qu'il n'existe pas des différences significatives au niveau des tissus sauf pour l'épiderme de *Pinus halepensis* Mill qui apparaît plus lignifiée c'est-à-dire présence de fibres sclerenchymateuses en grande quantités, ce qui lui confère une forte rigidité par apport au *Pinus maritima* et aussi par le nombre des canaux sécréteurs qui sont plus nombreux et plus volumineux chez *Pinus maritima* que chez *Pinus halepensis* Mill

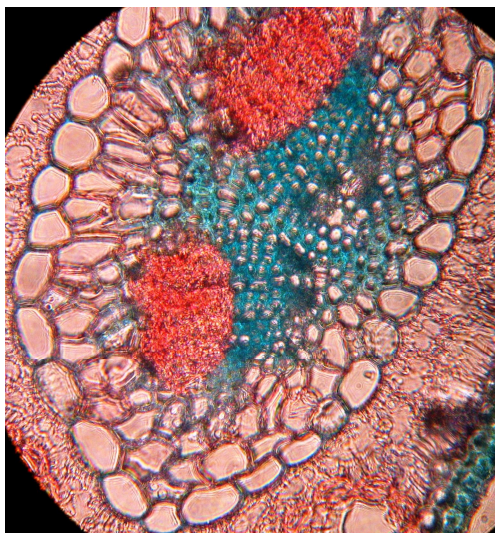


Figure 1 37: Coupe transversale de feuille *Pinus maritima* (GX100)

D'après la figure 1 37 nous constatons que les faisceaux libéro-ligneux sont enfermés dans un parenchyme particulier appelé parenchyme de transfusion, le tout étant délimité par un endoderme. Ce dernier est constitué de cellules pourvues de bandes de Caspary caractéristiques. Nos observations corroborent avec celles de (Gausen et al ,1982)

Les aiguilles de pin ont une structure xéromorphe caractéristique, elle est dite de type équifaciale ou chaque face est semblable, que ce soit d'un point de vue macroscopique ou microscopique; ce qui diffère beaucoup de celle d'une feuille normale. En effet la surface du limbe, extrêmement réduite (aciculaire comme chez beaucoup de conifères) pour diminuer la transpiration. Les résultats des coupes histologiques au niveau de feuilles de *Pinus halepensis*

et *Pinus maritima* sont comparables avec ceux de Speranza et al, 2006, sur les aiguilles des pinacées.

2/ Coupe histologique d'un rameau de *Pinus halepensis* Mill

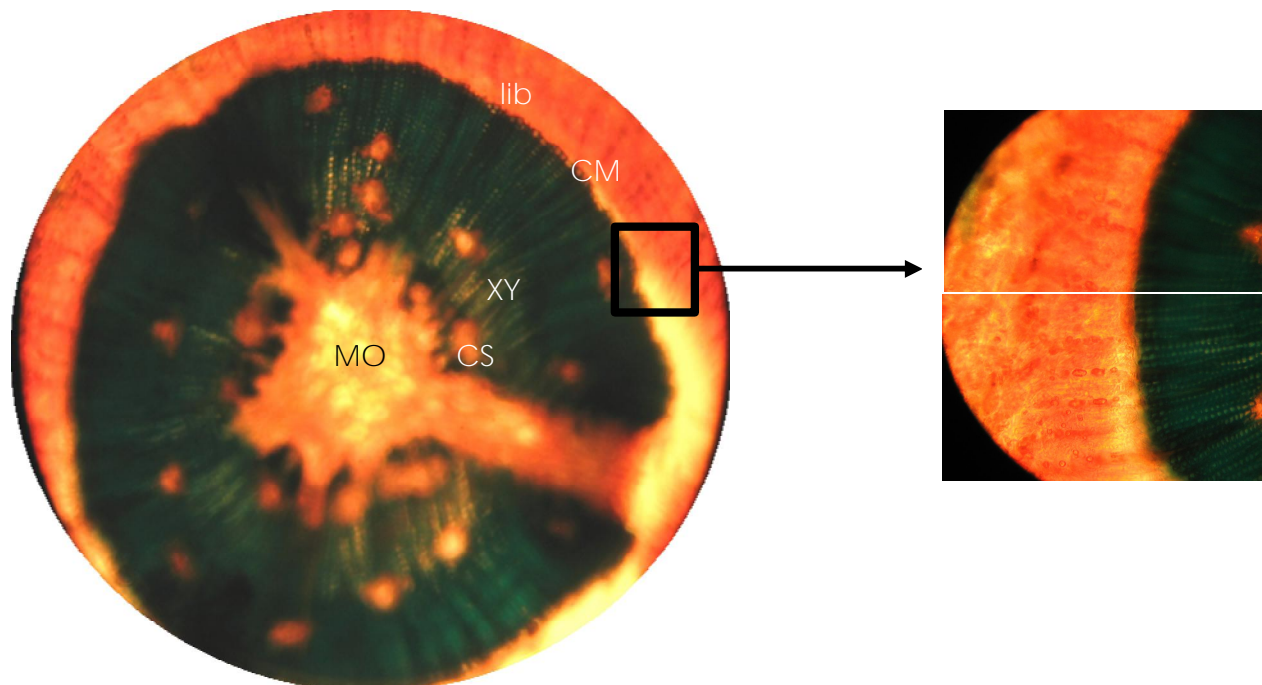


Fig 1 38: Coupe transversale d'un rameau de *Pinus halepensis* Mill (GX40)

L'Ecorce est constitué du suber ou liège, puis du phelloderme ne sont pas présenté dans la figure 1 38

D'après la figure 1 38, nous distinguons clairement des différentes zones, ainsi que la présence des taches en rose; ce sont des canaux sécréteurs (résinifères) d'une part dans l'écorce et d'autre part dans le cylindre central, mais elles sont plus volumineuses dans l'écorce.

Vers l'intérieur, des tissus de phloème secondaire (liber) coloré en rose puis le cambium est mis en valeur par le Vert intense

Le tissu cambial produit des jeunes cellules sur ses deux faces; à la face externe, elles se différencient en phloème (liber coloré en rose), les faces internes se différencient en xylème ou bois (vert intense)

Au centre on observe le parenchyme médullaire (MO) ou bien moelle colorée en rose.

Cette figure est comparable aux travaux de Meyer et al, 2004 sur des conifères (pinacées).

# Conclusion et perspectives

A l'issue de cette étude, nous avons pu avoir une connaissance sur l'usage du pin dans les deux Wilaya Annaba et El teref au moyen d'une enquête ethnobotanique, qui a révélée que le pin occupe une place importante dans notre patrimoine culturel, dans un intérêt aussi bien culinaire que thérapeutique surtout en usage interne pour le traitement de diverses affections respiratoires

Il apparait que les connaissances populaires et l'utilisation quotidienne des plantes en phytothérapie restent toujours assez fortes.

D'Après les tests phytochimiques préliminaires les feuilles de *Pinus halepensis* et *Pinus maritima* renferment différents métabolites secondaires tels que les tanins, les flavonoïdes, les saponines qui sont responsable d'activités pharmacologiques.

Le rendement des huiles essentielles obtenu à partir des feuilles de *Pinus maritima* récoltés de la région d'étude Hadada et Tonga (PNEK) et relativement faible (0,27 et 0,18 ). Chez *Pinus halepensis mill* récolté de la région de l'Embocure lac Mellah, le rendement est satisfaisant puisqu'il est comparable à celui des HE Commercialisé, de Zarouria reste faible(0,3%). La variation du rendement de la même espèce récolté de plusieurs régions a probablement une relation avec le climat, le type de sol, la pente, l'orientation, la période de récolte.

Notre étude est essentiellement basé sur la caractérisation chimique des huiles essentielles de *Pinus halepensis* et *Pinus maritima*, au moyen d'analyse par CG /SM nous a permet l'identification quantitative et qualitative des constituants ainsi que leur concentration .Selon les résultats obtenus, la composition chimique de HE diffère selon l'espèce et le site.HE en provenance de Hadada est à chimiotype  $\alpha$ -pinène. Celui de Tonga est à chimiotype  $\alpha$ -caryophyllène. L'HE de *Pinus halepensis* de l'Embouchure lac Mellah est à chimiotype  $\alpha$ -caryophyllène. Alors que celui de Zarouria est à chimiotype aromadendrene.

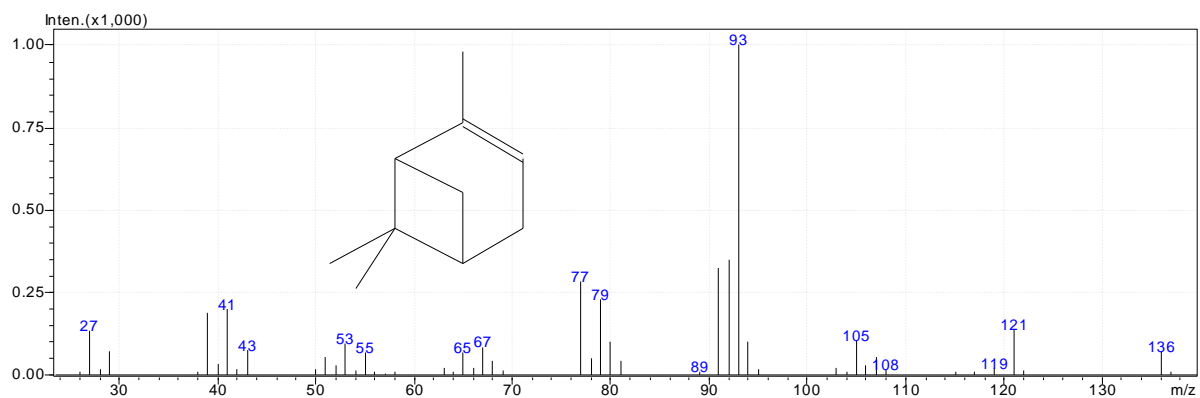
L'activité antibacterienes des HE *P. halepensis* et *P. maritima* testés in vitro sur trois souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli* est relativement faible.

Les performances antibactériennes mises en évidences méritent d'êtres étudiés avec plus de détails à fin d'envisager des perspectives d'applications de cette essence.

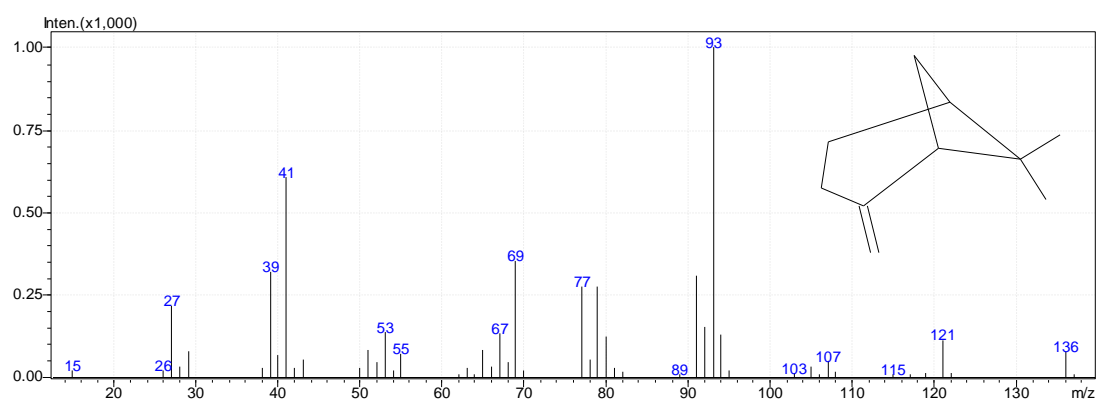
Etant donné que ces deux espèces végétales aromatiques n'ont pas fait objet de beaucoup d'études, jusqu'au jour d'aujourd'hui, il serait indispensable de focaliser des études sur cet aspect en tenant compte de l'âge de l'arbre ainsi que des feuilles, de la période de récoltes, et en utilisant des colonnes de séparation performantes.

# spectres de masses

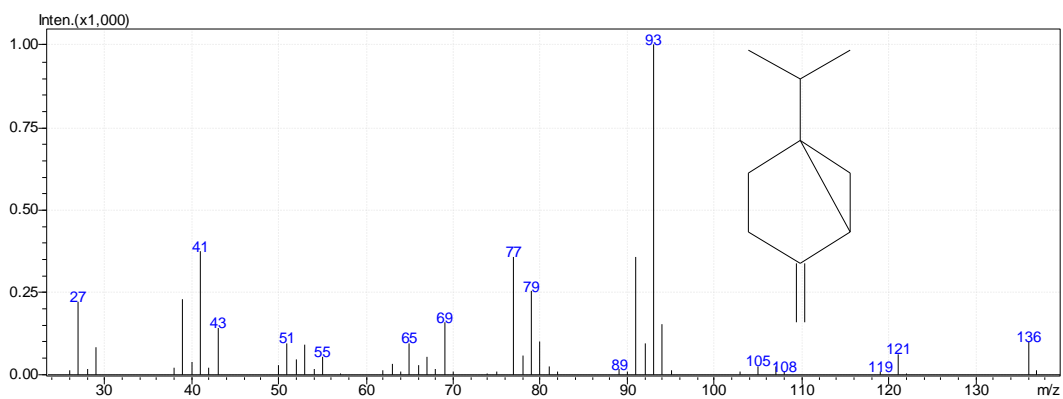
## 1- $\alpha$ Pinène



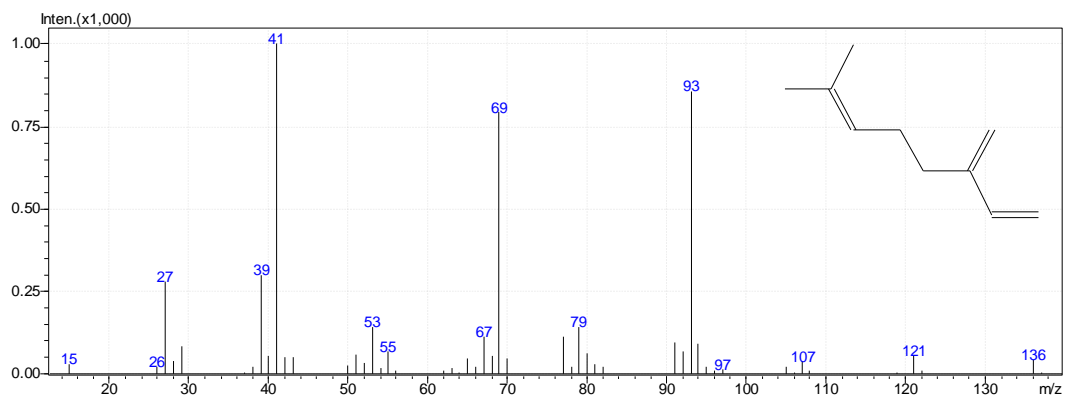
## 2- $\beta$ Pinène



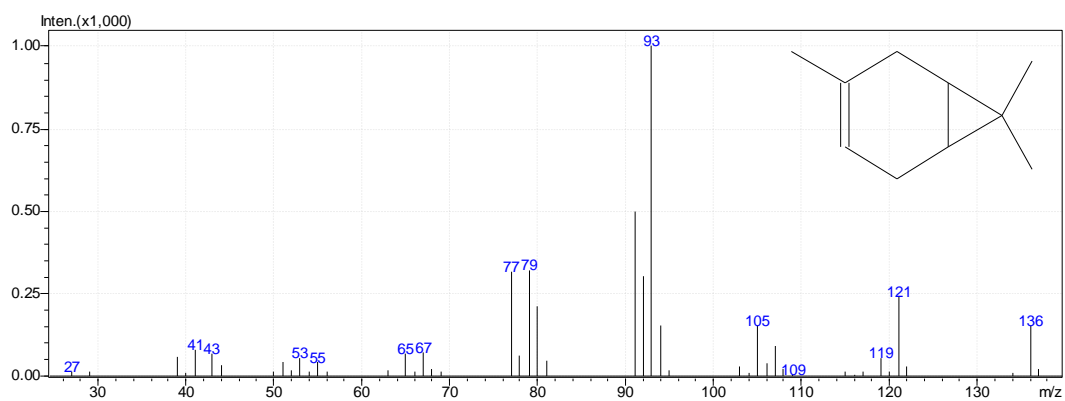
## 3- Sabinène



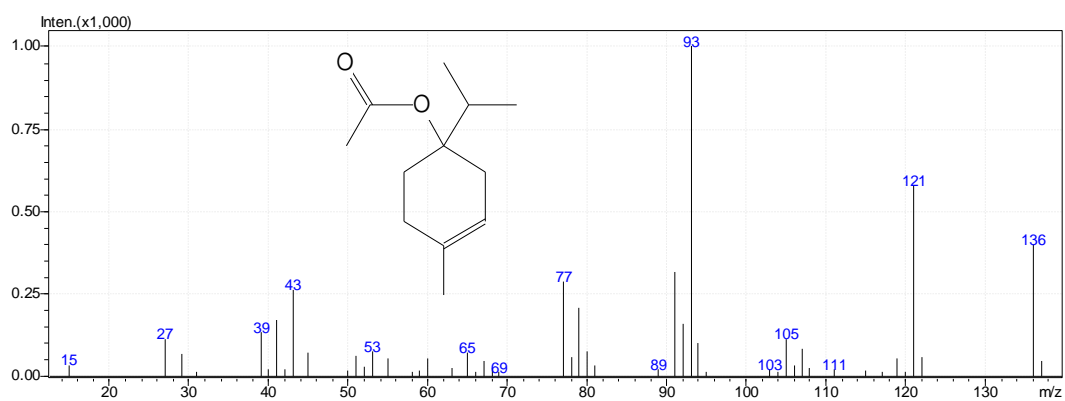
#### 4- $\alpha$ -Myrcène



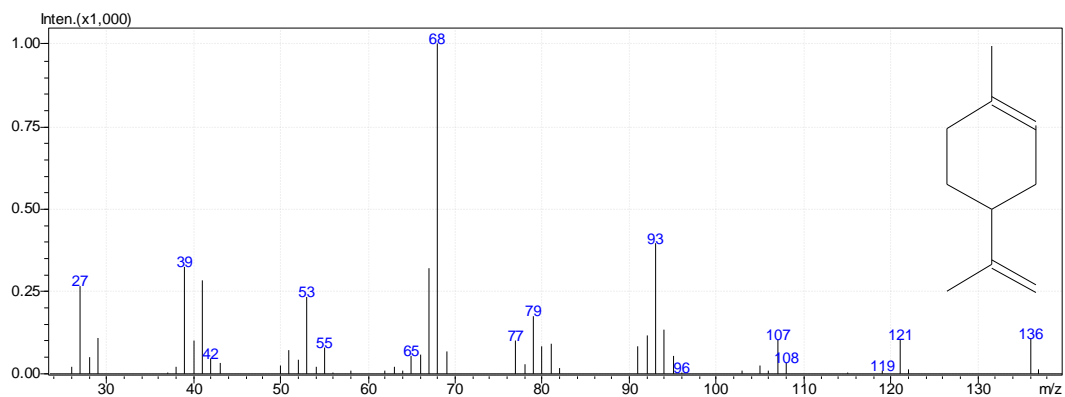
#### 5- $\beta$ -Carène



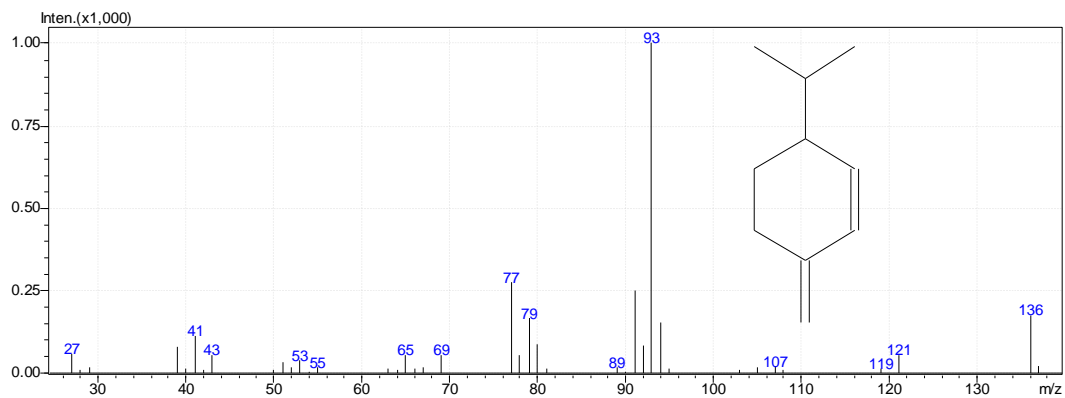
#### 6- 4-Terpinenyl acetate



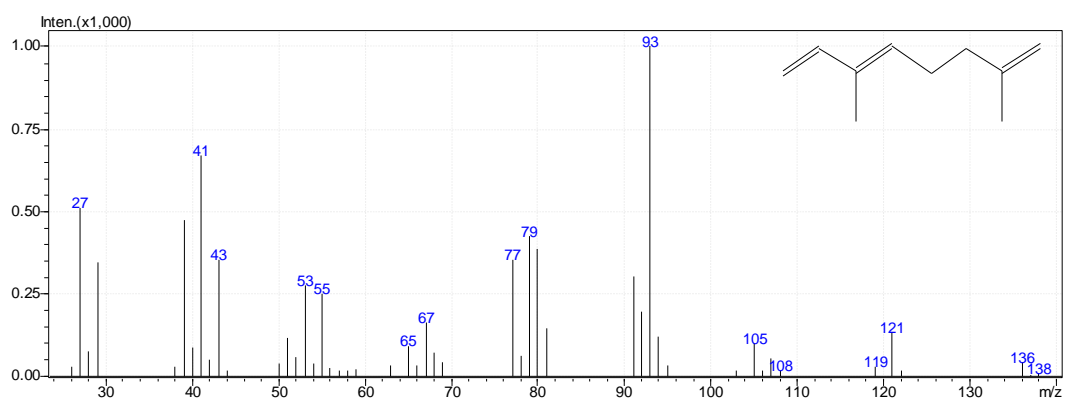
## 7- Limonène



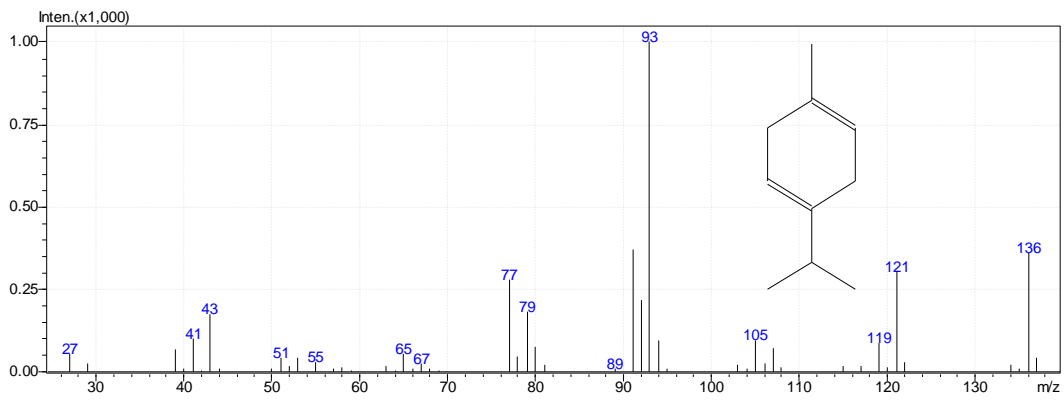
## 8- âPhellandrène



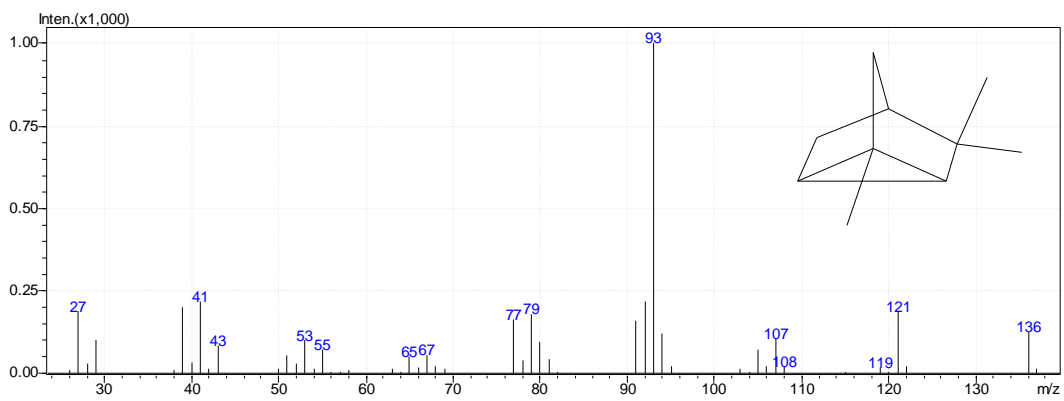
## 9- Ocimène



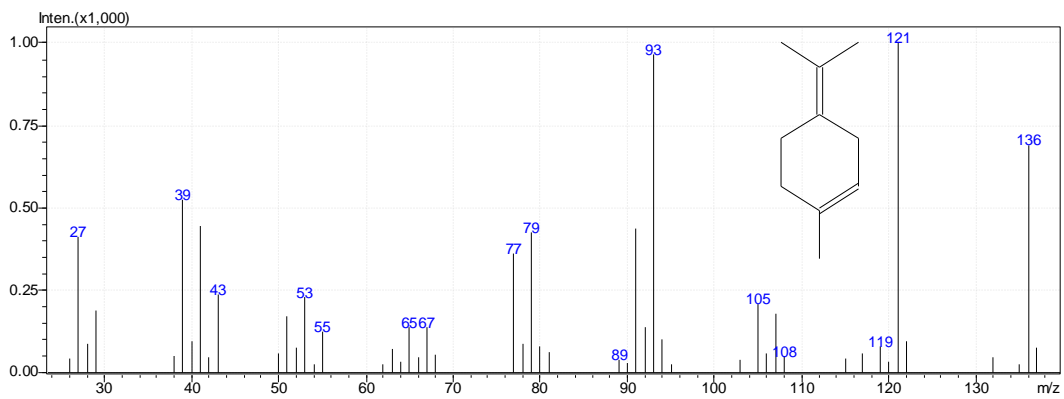
### 10- gamma.-Terpinene



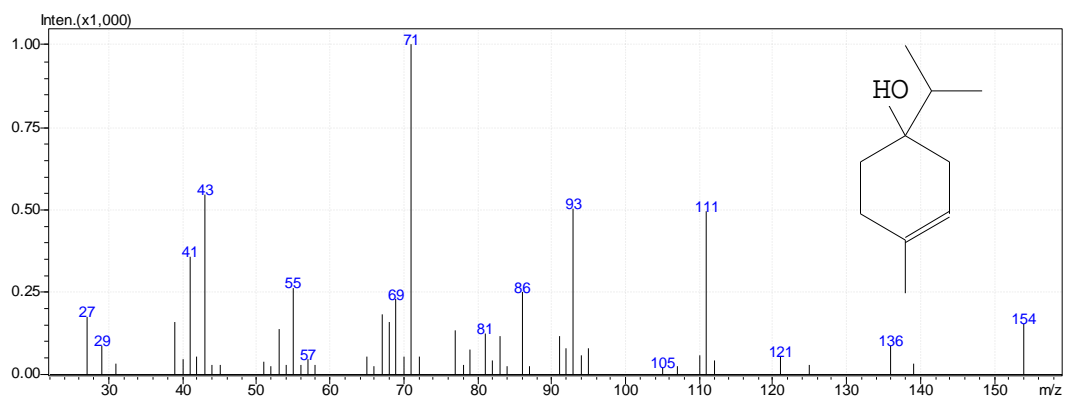
### 11- Cyclofenchène



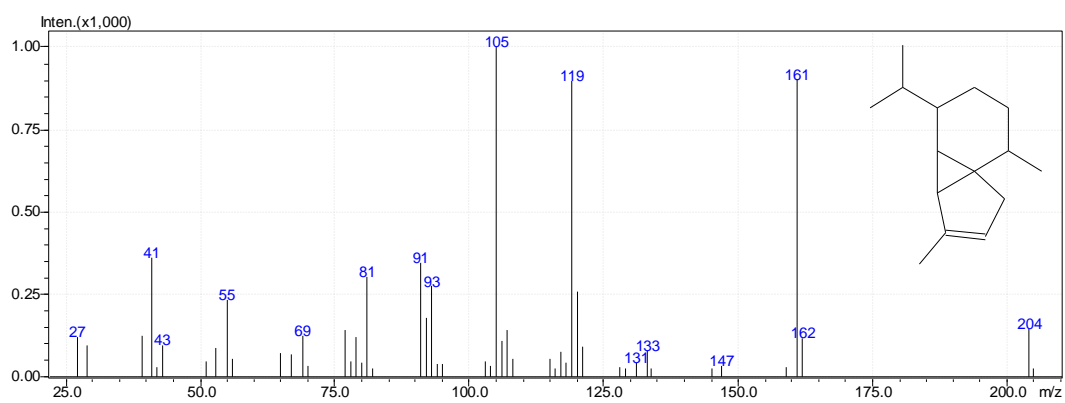
### 12- alpha.- Terpinolen



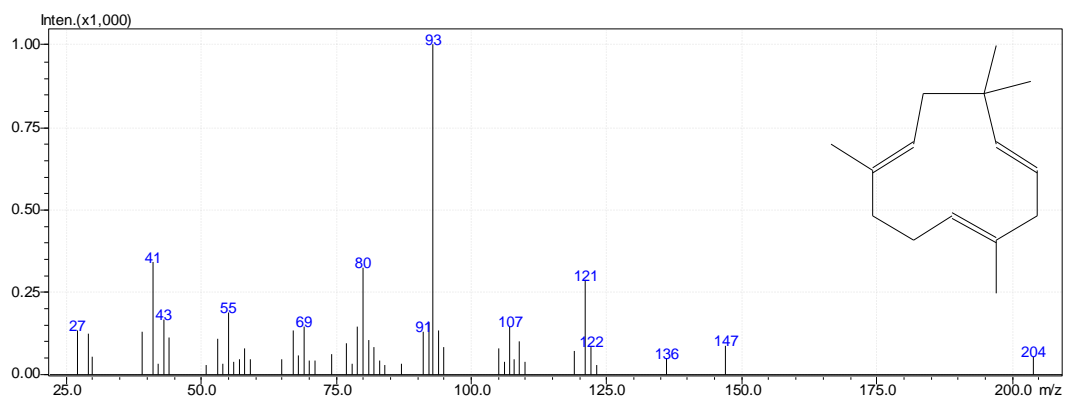
### 13- Terpinen-4-ol



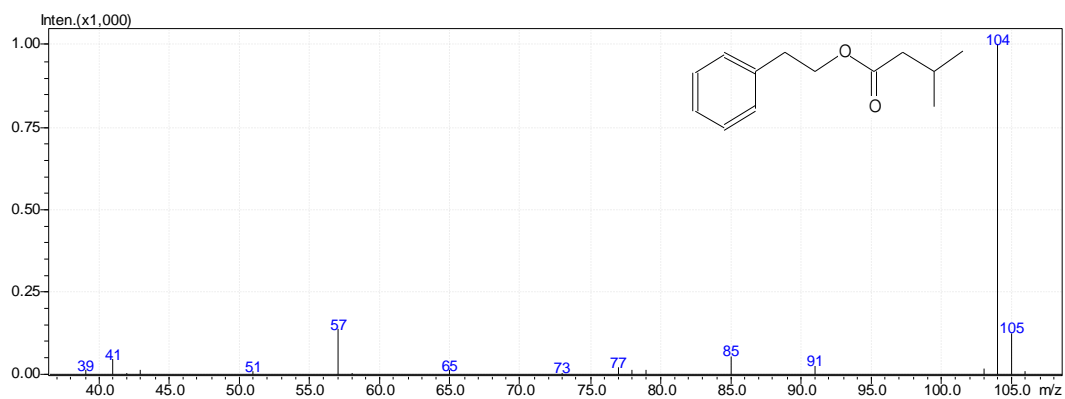
### 14- alpha.-Cubebene



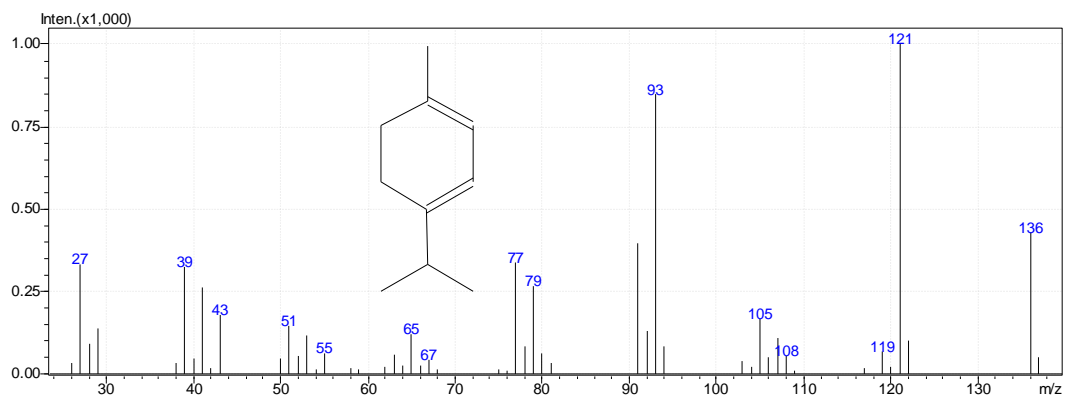
### 15- alpha.-Caryophyllene



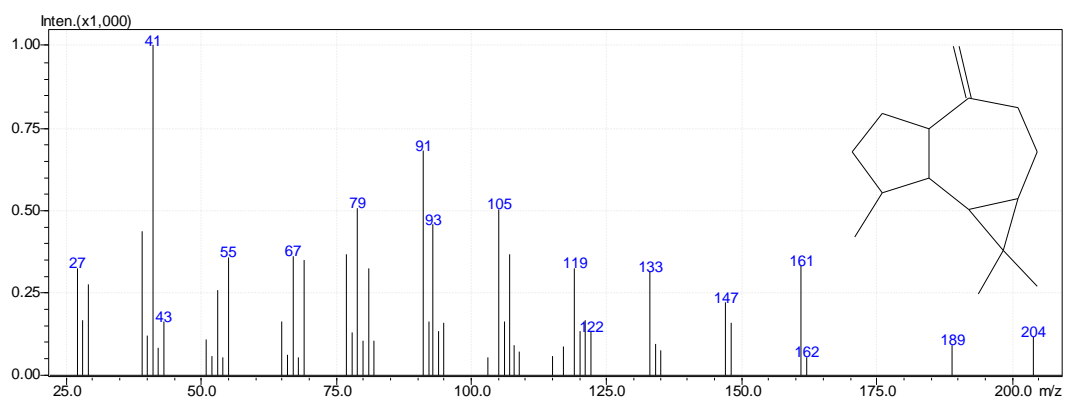
### 16--Phenylethyl isovalerate



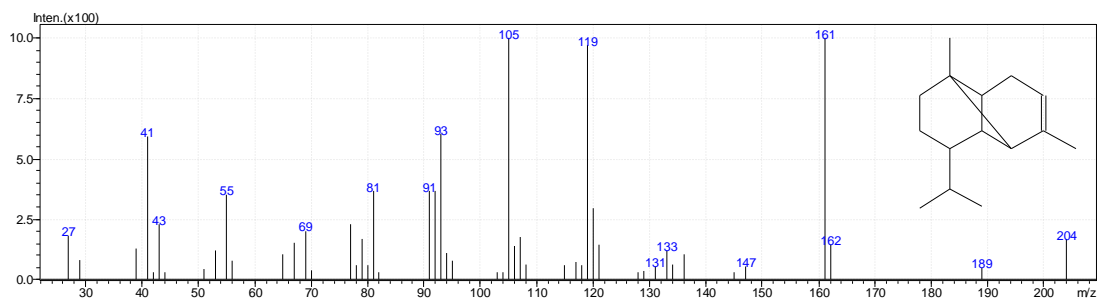
### 17-alpha.-Terpinen



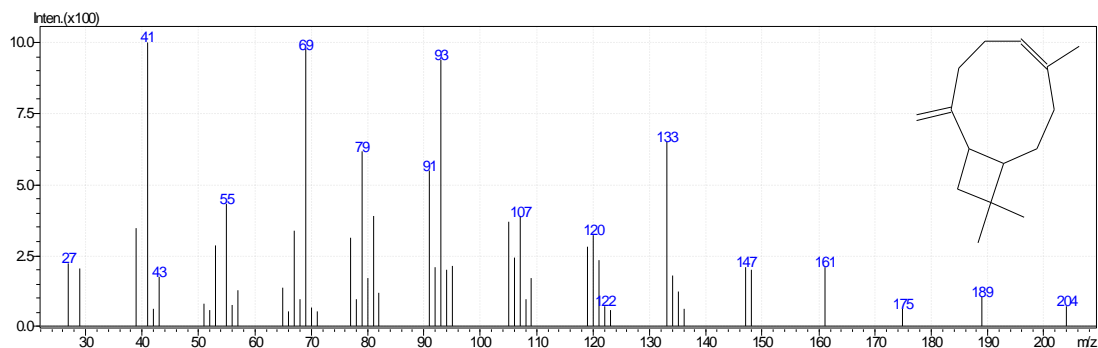
### 18-Aromadendrene



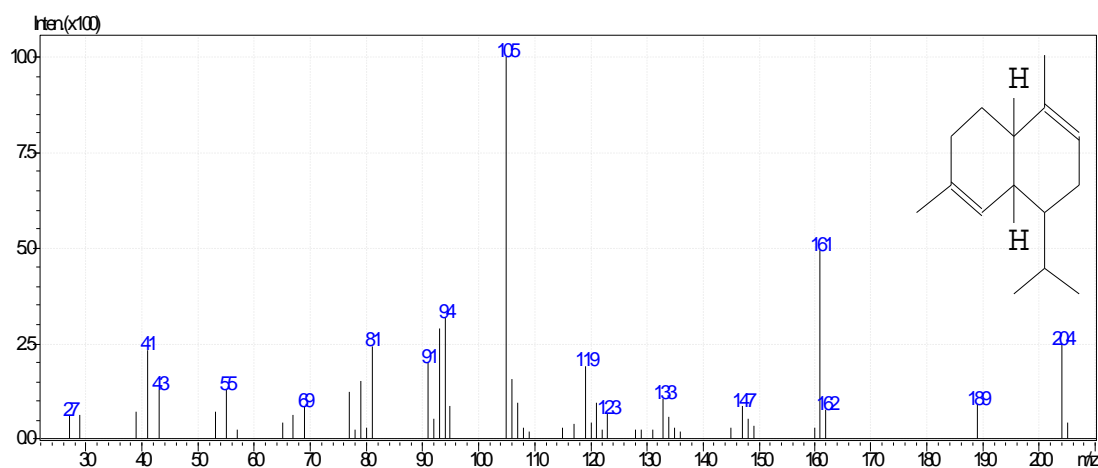
### 19-Copaene



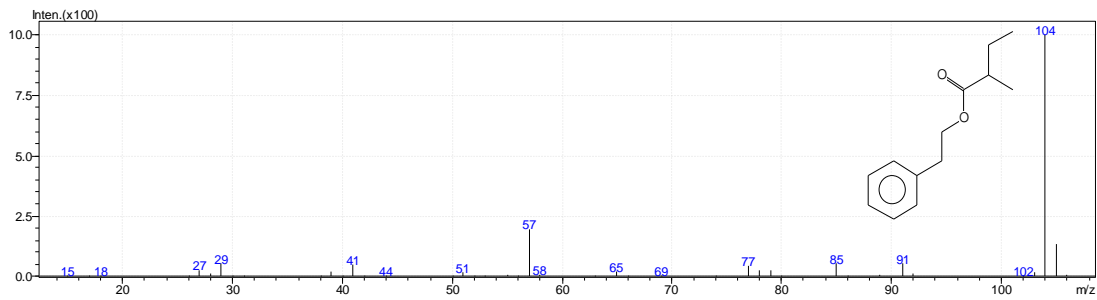
### 20 Caryophyllene



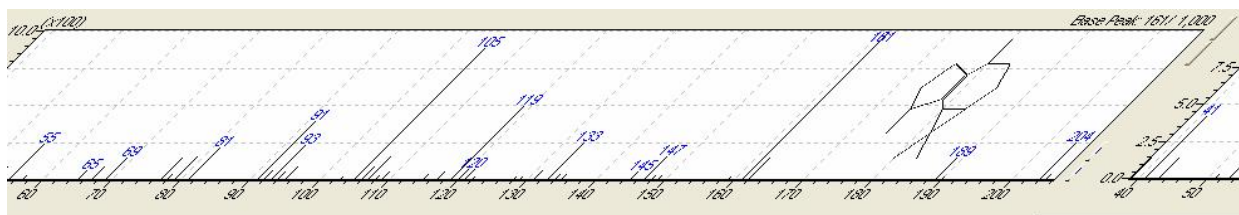
### 21- alpha.-Muurolene



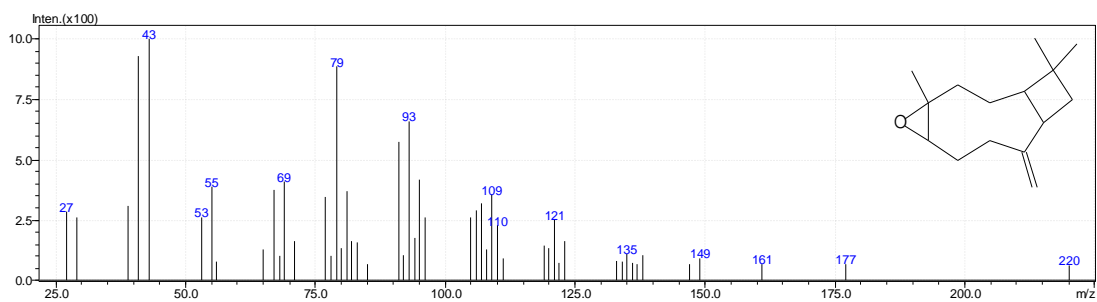
## 22-Phenethyl 2-methylbutyrate



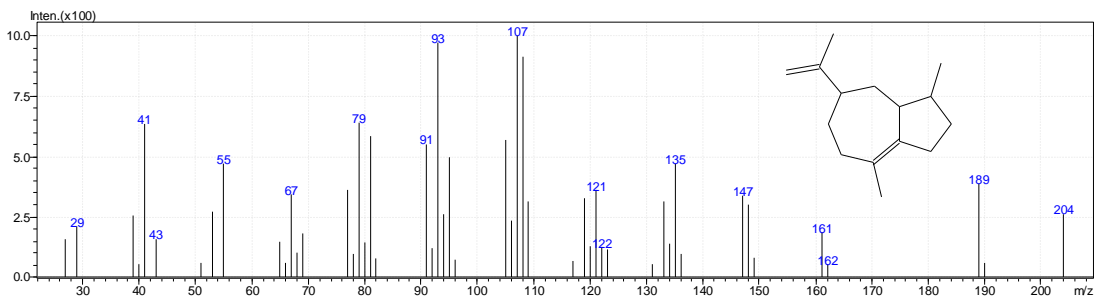
## 23-Isoledene



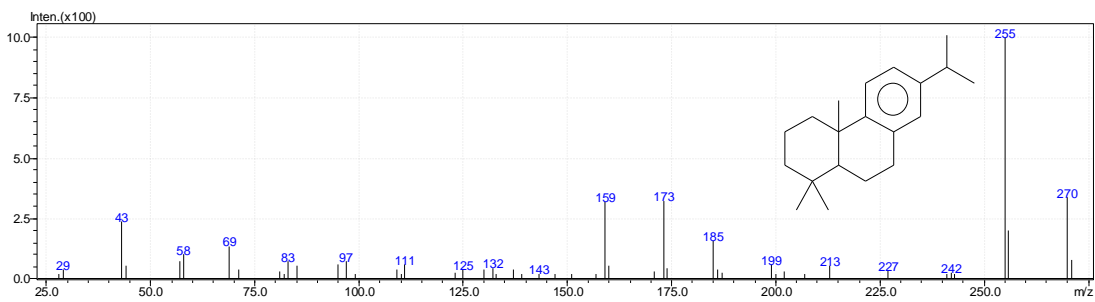
## 24-Caryophyllene oxide



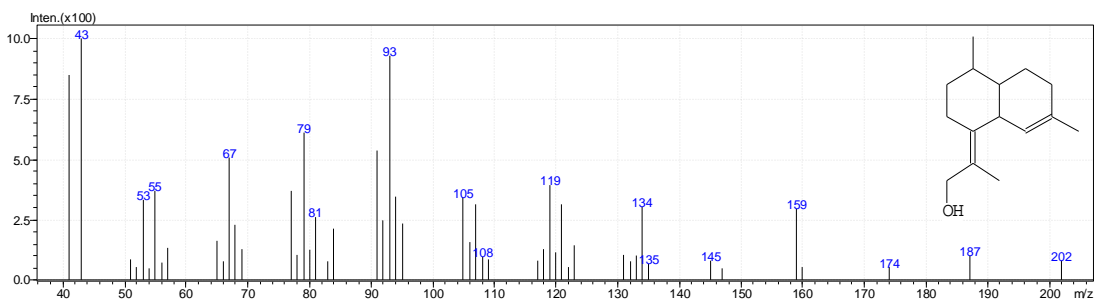
## 25- $\alpha$ -Bulnesene



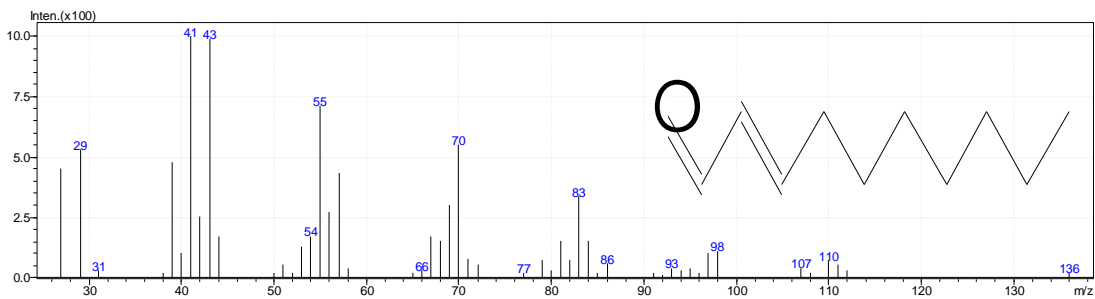
26-Abietatriene



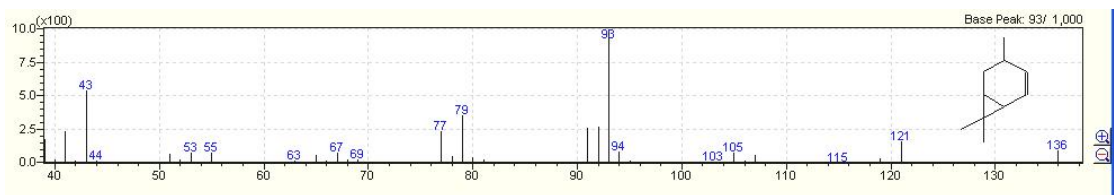
27-Lanceol, cis



28-Decenal, (E)



29-4-carene



# Refferences Bibliographiques

Allemand P. 1986. Espèces exotiques utilisables pour la reconstitution du couvert végétale. Ed. INRA. Paris, p. 53.

Angioni A., Barra A., Russo M. T., Coroneo V., Dessip S. & Cabras P. 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity ». J. Agric. Food Chem. 51, pp. 3073-3078.

Belaiche P.1991. Historique et prescription en aromathérapie .Encycl. Méd. Nat .Paris. C-1, pp. 20.

Belaiche P.1979.Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Masson, p.103.

Bellakhdar J. 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Ibis Press, Saint – etienne, pp.764.

Berredjem M., Regaïnia Z., Djahoudi A., Aouf N., Dewynter G&Montero J.2000. Synthèse et cyclisation de carboxylsulfamides dérivés d'amines et d'α-hydroxyesters. Evaluation de l'activité bactériostatique. In phosphorus, sulfur, and silicon and the related elements, volume 165, pp.249 – 264

Benyacoub S.& Chabi Y. 2000. Diagnose écologique de l'avifaune du Parc National d'El-Kala Revue des Sciences et technologie N°7.pp98.

Benyoucef E. Yahyaoui N. Khelfaoui A. & Aid F. 2005. Water distillation Kinetic study of spearmint essential oil and of its major components flavor frag.J., pp.20-33.

Beloued A. 2005. Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office des publications Universitaires. Alger, pp.284

Bentouati A.,Oujehih B.,& Alatou D. 2005. Croissance en hauteur dominante et classes de fébrilité du Pin d'Alep (*PINUS HALEPENSIS MILL.*) dans le massif de Oued-Yakoub et des Beni-oudjana (Khenchela-Aures),RevueSciences &Technologie C-N°23,pp.57-62.

Bezanger L. Pinkas M. & Torck M. 1986. Les plantes dans la thérapeutique moderne. Ed. Maloine. Paris, pp.11-18.

Bezanger L. ,Pinkas M., Torck M. & Trotin F. 1980. Plantes médicinales des régions tempérées .Ed. Maloine .Paris pp.31-32.

Bianchini F.& Corbella F. 1975. Atlas des plantes médicinales. Ed. Belin .Paris, pp.94-205.

Bonnier G.1990 : La grande flore en couleur. Ed. Belin. Paris, p.3254

Boullard B. 2001. Dictionnaire des plantes médicinales. Réalités et croyances. Ed. Estem ,pp.638.

Boureton H. & Ridayre B. 1977. Votre santé par les plantes. Ed. Gérard & C°. Belgique, pp. 5-12.

Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M. & Chaouch A. 2007. Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science* 03(2), pp. 232 – 242.

Brosse J. 2000. Larousse des Arbres et des Arbustes. Ed. Larousse Bordas. Paris, pp. 320

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie. Phytochimies et plantes médicinales Ed. Tec & Doc, Masson Inter3ed. Paris, pp. 484-574.

Cecchini T. 2003. Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Vecchisa. Paris, pp. 351.

Combes A. 1993. Arbres. Ed. Bordas, pp. 320-335.

Crémieux A. 1991. Perspectives méthodologiques dans l'évaluation de l'activité antibactérienne in vitro des huiles essentielles. *Encyc. Méd. Nat. Paris. C-5*, p. 8.

De Belair G. 1990. Structure, fonctionnement et perspectives de gestion de 4 éco-complexes lacustres et marécageux (El Kala, Est Algérien). Thèse de doctorat. Université Montpellier, pp. 193.

Djebar A.B., Messerer Y., Tandjir L. & Bensouilah M. 2003. Equilibres hydrologiques du Lac Mellah (Complexe Lacustre d'El Kala). *Revue Sciences & Technologie C-N°20*, pp. 15-20.

Djeddi S. 2008. Etude phytochimique, biologique et chimiométrique des substances naturelles isolées de : *Centaurea pulatta* L. d'Algérie et *Centaurea grisebachii* (Nyman) Heldr. ssp. *grisebachii* de Grèce. Thèse de Doctorat en Science Naturelle. Université Badji Mokhtar Annaba.

Djendli H. 2002. Inventaire des plantes toxiques au niveau du Parc National d'El Kala. Extraction des alcaloïdes de *Datura meteloides* L. Thèse Magistère. Université Badji Mokhtar Annaba.

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

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

Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idriss Hassani L.M., Badoc A. & Gmira N. 2003. Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea Lythroides* Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. <sup>1</sup> 142, pp. 61-78.

Duraffourd C., Lapraz J-C. & Chemli R. 1997. La plante médicinale de la tradition à la science. Ed. Grancher. Paris, pp.538.

Fellah S., Romdhane M., Abderraba M. 2006. Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia Officinalis* L. Cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie .Journal de la Société Algérienne de Chimie N°16, pp.193-202.

Garnero J. 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. Technique –Encycl. Méd. Nat. Paris. C2, p. 9-20.

Garnero J. 1996. Les huiles essentielles. Technique d'Ingénieur .K345, pp.1-12

Gausсен H., Leroy J. F., & Ozenda P. 1982. Précis de Botanique Végétaux supérieurs. Tome2. Ed. Masson. Paris, pp.52-74.

Grenand.P., Morethi C., Jagnemin H. & Prevost M.F. 2004. Pharmacopées traditionnelle en Guyane. Ed .IRD. Paris, pp.816.

Guignard J.L. 2000. Biochimie végétale. Ed. Masson. Paris, pp.182-191 et 246.

Halimi A. 2004. Plantes médicinales en Algérie. Ed. Berti. Alger, pp.163-165

Hernandez L. R. 2005. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale .Thèse docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse..

Hlava B., Posprsil E., & Stary F. 1984. La beauté par les plantes. Ed. Grund , Paris ,p.172

Ibdri S. 2006. Contribution à une étude morpho-histométrique et cartographique du genre *Phillyrea* dans la région de Tlemcen .Mémoire d'Ingénieur d'Etat .Facultés des Sciences. Université Abou Beker Belkaid .Tlemcen.

Iserin P. 1997. Encyclopédies des plantes Médicinales identification, préparation, soins Ed. Larousse-Bordas, pp.247.

Jeovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A. & Metodiev S. 2000. Seasonal depending variations of the composition and biological activities of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) essential oils from Bulgaria .Scientia Pharmaceutica N°66, pp.323-328.

Kabaisi H. 2002. Encyclopédie des herbes et des plantes médicinales. Ed. M.-A. Maison des livres scientifiques. Bayrouth. Liban 5<sup>em</sup>ed. pp556.

Kalra Y.P. & Maynard D.G. 1992. Methodes d'analyse des sols forestiers et des tissus végétaux .Ed. Forets Canada. Canada, pp.129.

Leclerc H. 1994. Précis de phytothérapie. Ed. Masson .Paris, p.257

Laouer H., Zerroug M.M., Shakir A.N., Khanchouche A., Sahli F., Birkaham B., Abbas A., Valentin G., Biondi R., Grande M. 2003. Etude comparative de l'activité anti

microbienne et la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne et fruit de l'*Ammoides pussilla*. Revue Sciences & Technologie. C-N°20, pp.11-18

Mahazier G., Hamon M., Ferrier D. & Prognon P. 1978. Chimie analytique, tome2. Ed. Masson. Paris, pp.124-270

Mahmoudi.Y. 1984. La Thérapeutique Par les Plantes les plus communes en Algérie . Ed. Palais du livre. Blida. p.87

Maire R. 1952. Flore de l'Afrique du Nord. Encyclopedie Biologique .Paris, pp.129-150

Meena M.R. & Sethi V. 1994. Antimicrobial activity of the essential oils from spices. J. Food Sci and Tech. MysoreN°31, pp.68-70.

Meyer S., Reeb C& Bosdeveix R.2004. Botanique biologie et physiologie végétale . Ed .Maloine .Paris, pp.461.

Nahal I. 1986. Taxonomie et aire géographique des pins du groupe halepensis .Options Méditerranéennes, Série Etude CIHEAM 86/1

Paris R.R. & Moyses H. 1976. Précis de matière médicale. Ed. Masson. Paris, pp.403

Paris M. & Hurabielle M. 1980. Abrège de matière médicale, Pharmacognosie. Ed. Masson .Paris, pp.2-248

Pharmacopée Européenne 5.0em edition ,2005pp.2747

Pharmacopée Belge 6.0 .1982 .V.4.5.8

Quezel P.& Santa S. 1963. Nouvelle flore de la l'Algérie et des Région désertiques méridionales. Ed. Centre national de la recherche scientifique. Paris, pp.31-40

Rehamnia Y. 2003. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de Romarin par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse, .Mémoire d'état en pharmacie. Faculté de pharmacie .Université Badji Mokhtar, Annaba.

Roth I. & Lindorf H. 2002. South American Medicinal plants .Ed. Springer. Berlin, pp.492.

Schauenberg P. & Paris F. 1977. Guide des Plantes médicinales. Ed. Delachaux&Niestlé. Paris. pp.7-291.

Stahal E., Dumont E., Jork H.,Kraus L.J., Rozumek K.E. & Schorn P.J. 1975. Analyse chromatographique et microscopique des drogues .Ed. Technique et documentation .Genève pp41.

Stenhagen E., Abrahamsson S. & MacLafferty F. W. 1976. Registry of Mass Spectral Data. Edits. Wiley and Sons, New York.The Mass Spectrometry Data Centre, 1986. Eight Peak Index of Mass Spectra, 3rd Ed. The Royal Society of Chemistry. Nottingham, Great Britain.

Speranza A& Calzoni G.L. 2006. Atlas de la structure des plantes .Ed. Belin. France, pp.223.

Tsitsimpikou C,Petrakis P.V.,Ortiz A.,Harvala C.& Roussis V. 2001. Volatile needle terpenoids of six *Pinus* species .Journal of Essential Oil Research .Vol13, pp.174-178.

Tranchant J. 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed .Masson .Paris, pp.606-627

Tranchant J. 1996. Chromatographie en phase gazeuse .Technique d'ingénieur..P1-485, pp.1-5

Vincent M.C.1991. l'aromatogramme.Encyclopédie de médecin naturelle, phytothérapie,aromatherapie-4,pp.6

Vilayleck E.2002.Ethnobotanique et médecine traditionnelle créoles .Ed.Ibis rouge. Paris,pp11-13

Wichtl M. & Anton R. 2003. Plantes thérapeutiques, 2èm Ed. Tec &doc, et E.Minter.Paris, pp.1-20

Wilhelm N.1998. Botanique Générale. Ed. Deboeck Universite. Paris, pp.316-342.