

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

Université A. MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

THÈSE

Présentée par:

Abdenour ADJAUD

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

Filière: Sciences Biologiques

Option: Biologie de la Conservation & Eco-développement Thème :

**LES HUILES ESSENTIELLES DU PIN NOIR DU DJURDJURA ET DU
SAPIN DE NUMIDIE : COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉS
BIOLOGIQUES**

Soutenue le: 27/01/2024

Devant le Jury composé de:

Nom et Prénom

Grade

M. BENHAMICHEN Nadir

M.C.A.

Univ. de Béjaïa

Président

M. LAOUERHocine

Professeur

Univ. de Sétif-1

Rapporteur

M^{elle}. OURARIMalka

M.C.A.

Univ. de Béjaïa

Examinateur

M. BEKDOUCHE Farid

Professeur

Univ. de Batna-2

Examinateur

M. AKKAL Salah

Professeur

Univ. de Constantine

Examinateur

M. GHERRAF Nouredine

Professeur

Univ. d'Oum El Bouagui

Examinateur

Année Universitaire: 2023/2024

« Le temps, la patience
adoucissent les plus cruelles
blessures.

On peut tout supporter »

Juliusz Slowacki

Remerciements

En utilisant une analogie peut-être audacieuse, une thèse me semble être un écosystème autonome, où la dynamique des idées évolue avec le temps, modifiée par diverses perturbations. Bien que ces perturbations puissent être négatives lorsqu'elles sont trop intenses, elles sont également formatrices, car même la plus minime d'entre elles stimule la renaissance d'idées. De plus, une thèse est caractérisée par une grande diversité de questions de recherche et d'études, ce qui la rend résiliente face aux défis.

Dès les premiers instants où j'ai commencé à explorer mon sujet, j'y ai investi de plus en plus d'énergie, stabilisant progressivement la thèse jusqu'à atteindre un équilibre, à l'image d'une fleur qui durcit ses pétales face aux brises matinales et résiste aux rayons ardents du soleil. Cependant, une thèse n'est pas seulement le fruit d'un travail individuel ; elle s'enrichit des interactions nouées avec et entre les chercheurs, les collègues, les proches et surtout lors des échanges et rencontres scientifiques. C'est pourquoi j'ai eu le plaisir de remercier chacun qui a contribué, même modestement ou avec un simple sourire, à la réalisation de cette thèse.

Ma chère mère **Zahra** qui m'a assisté dans le séchage de mes plantes. Elle a veillée sur le bon déroulement de cette étape fondamentale de mes travaux de thèse. Les mots de remerciements ne suffisent pas pour vous exprimer mes sensations profondes qu'un enfant voue à sa mère. Merci Maman et j'em'excuse pour les manquements causés par les lassitudes de la vie.

A mon père, pour son soutien indéfectible dans les différentes épreuves de la vie. Merci Si **El Hachemi**.

Monsieur **Laouer Hocine**, Professeur à l'université Ferhat ABBAS Sétif-1 pour m'avoir d'abord proposée une thématique qui m'a fascinée et qui cadre avec mon parcours en pédagogie-recherche. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités humaines et scientifiques, ses conseils et sa sympathie. Je lui adresse ma gratitude pour tout cela. Merci infiniment.

Je suis très honoré que M. **BEN HAMMICHE Nadir**, Maître de Conférences (A) à l'Université de Bejaia, ai bien voulu accorder son attention bienveillante à ce travail en acceptant de présider le jury. Qu'il soit assuré de mes sincères remerciements pour ses conseils et encouragements.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait M^{elle} **OURARIMalika**, Maître de Conférences (A) à l'Université de Bejaia, en acceptant de participer au jury de mathématiques et d'en être parmi les examinateurs de ce travail. Votre engagement et votre intérêt pour ce travail ont été des sources d'encouragement précieuses pour son achèvement. Je vous en suis sincèrement reconnaissant. Merci infiniment.

J'apprécie vivement l'honneur que me fait Monsieur **BEKDOUCHE Farid**, Professeur à l'université Batna-2, en acceptant de juger ce travail. Un grand merci qui, loin d'être un simple mot, est le reflet de mon respect et de mon estime profonds.

J'associe à ces remerciements M. **AKKAL Salah**, Professeur à l'université Mentouri de Constantine, pour avoir accepté d'examiner mon travail. J'ai apprécié l'attention et l'intérêt que vous portez à mon travail. Un grand merci.

J'adresse des sincères remerciements à M. **GHERRAF Noredine**, Professeur à l'Université d'Oum El Bouagui, en acceptant de faire partie de jury de ce travail de thèse. Merci pour l'intérêt que vous portez à mon travail et encore une autre fois, je vous exprime toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Bien sûr, atteindre ces objectifs n'aurait pas été possible sans l'appui et l'aide d'amis, de collègues et de chercheurs internationaux et de bienfaiteurs. Je désire en outre remercier vivement les amis de la nature, en particulier, M. **AIT ABED Momouh** du village Ait Ouabane (Kabylie du Djurdjura), et le vénérable **Aâmi Smail** du village Ait Felkai (Kabylie des Babors). Leur sympathie, leur amitié et leur dévouement à m'accompagner dans des endroits aussi dangereux qu'éblouissants de beauté. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Le cadre de travail était idéal.

Je désire grandement remercier M. **HADDAD Moussa** (ancien responsable du secteur Tekjedadu PND et actuel directeur du PNG) et M. **MERAH Youcef**, agent du PND et guide de montagne (secteur Tala guilef) de m'avoir accordé toutes les facilités pour se rendre à l'intérieur du territoire du PND.

Je tiens à exprimer une pensée très spéciale à mes collègues et précieux amis, M. **BENKHENNOUCHENordine** et **ABBACIHocine**. Les mots de gratitude ne suffisent pas pour témoigner de mon profond respect et de ma reconnaissance envers votre contribution directe à mon travail de thèse. Merci du fond du cœur.

Je suis particulièrement reconnaissant envers M. **MOUSSI Kamal** et Mme. **RAHMANI-BERBOUCHA Meriem**, des âmes sincères et dévouées, pour leur aide scientifique et leur engagement dans la valorisation des résultats de cette thèse. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec eux. Le cadre de travail était idéal. Merci infiniment.

Je remercie également M. **RAMDANI Nacer**, collègue et ami à la FSNV, pour m'avoir généreusement ouvert les portes du laboratoire pédagogique dont il est responsable et surtout pour avoir mis à ma disposition son expertise et le matériel nécessaire à la réalisation de mes expérimentations. Merci infiniment.

Mes collaborateurs internationaux, l'équipe de recherche du laboratoire des Fluides Supercritiques, de l'Université de Cagliari (Italie), anciennement dirigé par le professeur **Bruno MARONGIU**, remplacé par le Professeur **Silvia PORCEDDA** et accompagné par le Dr. **Danilo FALCONIERI** et le Dr. **Alessandra PIRAS**. Ils m'ont accueilli dans leur laboratoire et ont mis à ma disposition le matériel nécessaire pour réaliser mes expérimentations de GC-MS. J'ai bénéficié de leur savoir-faire en la matière. J'ai beaucoup apprécié surtout leur humanisme, leur modestie et leur aide et assistance sans faille jusqu'au jour d'aujourd'hui. Je vous exprime mon profond respect et ma reconnaissance.

Merci à **Oliveira POLITEO**, Professeur à l'université of Split (Croatie), pour son humanisme, l'aide et l'assistance technique et scientifique, lors de la réalisation des activités enzymatiques de mes extraits et aussi dans les corrections de notre article sur *A.numidica*.

J'associe à ces remerciements M. **Franko Burčul**, Professeur à Université de Zagreb, Faculté de génie chimique et de technologie, pour m'avoir aidé dans les expériences sur les activités enzymatiques de mes extraits ainsi que dans la révision de notre article de recherche sur *A.numidica*.

Ma gratitude et mes profonds remerciements vont à l'encontre du Professeur **Felix TOMI** et du Dr. **Mathieu PAOLI** de l'université de Corse (France), pour leur aide dans l'analyse de mes échantillons d'huiles essentielles.

Je tiens à remercier le Professeur **Alessandra BRACA** et le Dr. **Pier Luigi CIONI** de l'université de Pisa (Italie), pour leur aide dans la caractérisation de mes huiles essentielles par GC-MS et SPME-GC-MS.

En hommage à la noble mémoire du Professeur **Robert ADAMS**, qui, de son vivant, m'a agréablement surpris en acceptant ma demande d'assistance scientifique pour la caractérisation de mes huiles essentielles et en me faisant don de son livre « *Juniperus of the world* ». Je lui suis profondément reconnaissant et je dédie cette thèse à sa mémoire.

Mapensée à **OUARDA**, la mère de mes enfants **INE** et **AKSIL**, pour vous tous merci pour votre patience et surtout d'avoir supporté mes excès de nerfs. Merci.

Enfin, à ceux qui ont semé le désordre, merci de m'avoir mis des obstacles et perturbé ma volonté de faire mieux. Vos actes de blocage sont si valeureux et stimulants et je suis enfin arrivé. Merci infiniment.

Dédicaces

*À tous les êtres quime
sont chers*

Publicationsetcommunications

Les travaux de recherche que nous avons menés ont fait l'objet d'une publication internationale dans "Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology", un deuxième article soumis et accepté dans "Journal of Essential Oil Research ", deux communications internationales.

Publication

A. Adjaoud, H. Laouer, A. Braca, P. Cioni, K. Moussi, M. Berboucha-Rahmani, , H. Abbaci and D. Falconieri. Chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of a new essential oil chemotype of *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* (Pinaceae), Northern Algeria. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(2), 358-369, 2022.

Abdenour Adjaoud, Hocine Laouer, Olivera Politeo , Hocine Abbaci, Franko Burčul, Kamal Moussi, Ouarda Adjaoud-Benkhellat, Mathieu Paoli and Félix Tomi. Chemical profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of essential oils of an endemic Algerian species: *Abies numidica*. De Lannoy ex Carrière. *Journal of Essential Oil Research*, xx(x), xx-xx, 2023.

Communicationsinternationales

Abdenour Adjaoud, Ouarda Adjaoud-Benkhellat et Hocine Laouer. Potentialité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. Dans la lutte biologique contre la bruche d'haricot (*Callosobruchus maculatus* F). **1st International Seminar on Medicinal Plants, Health and Environment (SI-PMSE'13), M'sila University, Algeria 20-21 October 2013.**

Abdenour Adjaoud, Ouarda Adjaoud-Benkhellat, Danilo Falconieri, Bruno Marongiu et Hocine Laouer. Composition chimique et activités biologiques des huiles essentielles de deux Pinaceae d'Algérie. **International Congress on Aromatic and Medicinal Plants (CIPAM 2014), Zarzis (Tunisia), March 17-20 (2014)**

-

Sommaire

Sommaire

Remerciements	I
Dédicaces	V
Publicationsetcommunications	VI
Sommaire.....	VII
Listedesfigures.....	XIII
Listedestableaux.....	XVI
Liste d'abréviation	XVIII
Introduction.....	1
Référencesbibliographiques	4

Revuebibliographique

I. Les substances volatiles : la famille des terpènes	7
II. Généralités sur les huiles essentielles.....	7
II.1. Définition.....	7
II.2. Historique	8
II.3. Répartitionbotanique,lieux deformationet d'accumulation	9
II.4. Propriétésphysico-chimiquesdeshuilesessentielles.....	10
II.5. Compositionchimique	10
II.5.1. Lesterpènesouterpénoides.....	11
II.5.2. Biosynthèsedesterpènes	11
II.5.2.1. Origineetdiversitédes terpènes.....	11
II.5.2.2. Lesvoies desynthèse del'IPP etleur compartimentation	14
II.6. Classificationdesterpènes	16
II.6.1. Leshémiterpènes	17
II.6.2. Lesmonoterpènes	17
II.6.3. Lessesquiterpènes	18
II.6.4. Lesditerpènes	19
II.6.5. Lessesterpènes	19
II.6.6. Lestriterpènes.....	19
II.6.7. Lestétraterpènes	20
II.6.8. Lescomposésaromatiques	20
II.6.9. Lescomposésd'originediverses	20
II.7. Rôledeshuilesessentiellesdanslevégétal.....	23
II.8. Lesfacteursdevariabilitédelacompositionchimiquedeshuiles essentielles	24
II.9. Lestechniquesd'extractiondeshuiles essentielles.....	25

Sommaire

II.9.1. Ladistillation	26
II.9.2. Expressionàfroid.....	27
II.9.3. L'extractionparsolvantsvolatilsdesextraitsaromatiques	28
II.9.4. L'extractionparCO ₂ subcritique(CS-CO ₂).....	29
III. Phénomènes physico-chimiques et facteurs altérant les huiles essentielles	31
IV. Méthodes d'analyses des huiles essentielles	32
IV.1. Lachromatographie enphase gazeuse (CPG)	33
IV.1.1. Fonctionnement	33
IV.1.2. Identification	35
IV.2. Le couplage CPG/SM	35
V. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	38
V.1. Activitéantibactérienne.....	38
V.2. Activitéantifongique.....	41
V.3. Activitéherbicide	44
V.4. Activitéinsecticide	46
V.5. Activitéantioxydante	48
V.6. Activitéanti-acetylcholinésterase.....	50
V.6.1. AChE	50
V.6.2. BChE	51
VI. Descriptions des plantes étudiées.....	54
VI.1. A- <i>Pinusnigrassp.mauretanica</i>	54
VI.1.1. Synonymieetnomsvernaculaires.....	54
VI.1.2. Taxonomieetsystématique.....	54
VI.1.3. Descriptionbotanique	56
VI.1.4. Diversité,Écologieetrépartitiongéographique.....	57
VI.2. <i>Abiesnumidica</i>	58
VI.2.1. Synonymieetnomsvernaculaires.....	58
VI.2.2. Taxonomieetsystématique.....	59
VI.2.3. Descriptionbotanique	60
VI.2.4. Diversité,Écologieetrépartitiongéographique.....	60
VI.2.5. Utilisationenmédecinetraditionnelle	62
VI.2.6. Donnéesphytochimiquesetpharmacologiques	62
Référencesbibliographiques	63

Matériels&Méthodes

Motivations.....	80
I. Matériels & Méthodes	81
I.1. Matériel végétal de l'étude des huiles essentielles	81
I.2. Extraction des huiles essentielles.....	82
I.2.1. Extraction par hydrodistillation (HD).....	82
I.2.2. Microextraction en Phase Solide (SPME)	83
I.3. Calcul du rendement en huile essentielle	83
I.4. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles	84
I.4.1. Détermination de la densité relative (AFNOR NF-T75-111)	84
I.4.2. Détermination de l'indice de réfraction (AFNOR NF-T75-112).....	84
I.4.3. Indice d'acide	85
I.4.4. Indice de peroxyde	86
I.5. Analyse des huiles essentielles	86
I.5.1. Cas des HES de <i>A. numidica</i> et cônes de <i>P. nigra</i>	87
I.5.1.1. Chromatographie en phase gazeuse- détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)	87
I.5.1.2. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS)	87
I.5.1.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)	87
I.5.1.4. Identification des composants individuels	88
I.5.2. Cas des HES des aiguilles et des branches de <i>P. nigra</i>	88
I.5.2.1. Analyse HS-SPME.....	88
I.5.2.2. Analyse GC-EIMS	88
II. Activité biologiques	89
II.1. Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles	89
II.1.1. Activité scavenger du radical DPPH [•]	89
II.1.2. Activité de piégeage du radical ABTS ^{•+}	89
II.1.3. Essai de blanchissement de β -carotène.....	90
II.1.4. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium	91
II.1.5. Activité antioxydante totale (Test au phosphomolybdate)	91
II.2. Évaluation de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase/butyrylcholinestérase.....	91
II.3. Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	92
II.3.1. Préparation des pré-cultures.....	92
II.3.2. Méthode de diffusion	93
II.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	93

Sommaire

II.4. Évaluationdel'activitéantifongiquedeshuilesessentielles	93
II.4.1. Identificationetconservationdessouchesfongiques.....	93
II.4.2. Modeopératoiredel'essaidel'activitéantifongique.....	94
II.5. Évaluationdel'activitéinsecticidedeshuiles essentielles.....	95
II.5.1. Elevagedemassedesinsectes.....	95
II.5.2. ConduitedesessaisdetoxicitédesHESaulaboratoire	95
II.5.2.1. Toxicitédecontact.....	95
II.5.2.2. Testd'inhalation	96
II.5.2.3. Testderépulsionsurpapierfiltre	97
II.5.3. Calculdesdescripteursnumériquesde toxicité.....	98
II.6. Évaluationdel'activitéherbicidedeshuiles essentielles.....	98
II.6.1. Conduitedesessaisdephytotoxicité	99
II.6.1.1. Stadergerminatif.....	99
II.6.1.2. Stadeadulte.....	100
II.6.1.2.1 Intégritémembranaire.....	100
II.6.1.2.2 Peroxydationdeslipides.....	100
II.6.1.2.3 Productiondeperoxyded'hydrogène(H ₂ O ₂)	101
II.6.1.2.4 Teneurenproline.....	101
II.6.1.2.5 Synthèsechlorophyllienne(dosagedelachlorophylle totale)	102
II.6.1.2.6 Teneureneau.....	102
II.7. Analysestatistiquedesdonnées	102
Référencesbibliographiques	103

Resultats&Discussions

I. Analysedeshuilesessentielles:Propriétésphysicochimiquesetcompositionchimique

I. Etude des huiles essentielles extraites de <i>P. nigra</i> et d'<i>A. numidica</i>	106
I.1. Le rendement	106
I.2. Propriétésphysicochimiques	108
I.3. Etudedelacomposition chimiquedeshuilesessentielles.....	110
I.3.1. <i>Pinusnigrasp.mauretanica</i>	110
I.3.1.1. Aiguilleset branches.....	110
I.3.1.2. Lescônes.....	124
I.3.2. <i>Abies numidica</i>	135
II.Activitésbiologiquesdeshuilesessentielles.....	152

Activitésantioxydantes&antiacétylcholinestérase	153
II. Les activités biologiques	152
II.1. Activitésantioxydantes	152
II.1.1. Activitéscavengerduradical DPPH [•]	152
II.1.2. Activitéantiradicalairedel'ABTS ^{•+}	155
II.1.3. Testauphosphomolybdate	157
II.1.4. Pouvoirréducteurauferricyanuredepotassium	159
II.1.5. Evaluationdel'activitéantioxydanteparlaméthodeβ-carotène/acidelinoléique	161
II.2. Évaluationde l'activité anticholinestérase	163
Référencesbibliographiques	166
Activitésantibactériennes& antifongiques	
III. Activités antibactériennes des Huiles Essentielles de <i>P. nigra</i> et d'<i>A. numidica</i>	171
III.1. <i>Pinusnigrasp.mauretanica</i>	171
III.2. <i>Abiesnumidica</i>	176
IV. Activités antifongiques des Huiles Essentielles de <i>P. nigra</i> et <i>A. numidica</i>	183
Référencesbibliographiques	187
Activités insecticides	
V. Évaluation de l'activité insecticide des huiles essentielles sur <i>Callosobruchus maculatus</i> (F)	189
V.1. Évaluationdel'effetparcontactdeshuilesessentielleessur <i>C.maculatus</i>	189
V.2. Evaluation del'effetdeshuilesessentielles par inhalation(fumigation) sur <i>C.maculatus</i>	196
V.3. Évaluationdel'effetrépulsifdeshuilesessentielleessurlesadultesde <i>C.maculatus</i>	203
Référencesbibliographiques	207
Activités herbicide	
VI. Évaluation de l'effet herbicide des huiles essentielles de <i>P. nigra</i> et d'<i>A. numidica</i>	210
VI.1. Stadepré-germination(graine)	210
VI.2. Stadepost-germination(plantule).....	219
VI.2.1. EffetdesHEssurl'intégritémembranairedesfeuillesdesplantulestraitées	219
VI.2.2.EffetdesHEssurlaperoxydationlipidiquedesfeuillesdesplantulestraitées	222

Sommaire

VI.2.3. Effet des HEs sur la production du H_2O_2 dans les feuilles des plantules traitées	226
VI.2.4. Effet des HEs sur l'accumulation de proline au niveau des feuilles des plantules traitées	229
VI.2.5. Effet des HEs sur la teneur en chlorophylle totale des plantules traitées	232
VI.2.6. Effet des HEs sur la teneur en eau des plantules traitées	236
Références bibliographiques	240
Conclusion	244
Annexes	249

Listedesfigures

Figure1: Photographie de quelques structures histologiques des sécrétions des HES	9
Figure2: Origine structurale des terpènes	13
Figure3: Les voies de synthèse de l'IPP et le DMAPP	15
Figure4: Sites de biosynthèse des terpénoïdes	15
Figure5: Compartimentation des voies de synthèse de l'IPP et le DMAPP	16
Figure6: Structure de quelques terpènes communs aux HES	23
Figure7: Schéma d'un appareil de type Clevenger	26
Figure8: Principe d'entraînement à la vapeur d'eau et d'hydrodiffusion	27
Figure 9: Méthode Pellatric (appareillage de type pellatrice avec hélice d'Archimède dopée aux citrons, lavée à l'eau)	27
Figure10: Schéma de quelques fumatrices	28
Figure11: Dispositifs d'extraction par solvants volatiles	29
Figure12: Une représentation simplifiée d'une installation d'extraction au CO ₂ supercritique	30
Figure13: Réactions de conversion possibles dans les huiles essentielles	32
Figure14: Méthodes d'analyses d'un mélange complexe	38
Figure15: Les cibles présumées des huiles essentielles	40
Figure16: Effet direct ou indirect des molécules allélochimiques	46
Figure17: Position phylogénétique de <i>Pinus nigra</i> ssp. <i>mauretanica</i>	55
Figure18: <i>Pinus nigra</i> ssp. <i>mauretanica</i> . Jeune souche (a) et cônes femelles immatures (b). Vieux sujet (c) et détail du tronc (d)	56
Figure19: Vue d'une partie du peuplement naturel de <i>Pinus nigra</i> ssp. <i>mauretanica</i> (a) en mélange avec le cèdre. Réserve parc national du Djurdjura	58
Figure20: Position phylogénétique d' <i>Abies numidica</i>	59
Figure21: <i>Abies numidica</i> . Cônes femelles immatures recouverts de résine (a) et écailles aplatis de cônes femelles matures (b). Jeune souche (c) et détails des rameaux (d)	60
Figure 22: Vue d'une partie du peuplement naturel d' <i>Abies numidica</i> du mont Tababort sur pentes escarpées et pierreuses (a) Détail de l'ambiance forestière (b)	61
Figure23: Dessin schématisé d'un hydrodistillateur de type Clevenger.	82
Figure24: Représentations schématisées de la SPME. A: extraction des analytes. B: désorption thermique et analyse en GC-MS	83
Figure25: Aspects morphologiques des espèces fongiques étudiées	94

Listed figures

Figure 26: Elevage de masses de bruches au laboratoire (étuve réglée à 30°C).	95
Figure 27: Photographie du dispositif expérimental de la toxicité par effet contact des HES sur graines d'eniébé.	96
Figure 28: Photographie du dispositif expérimental de la toxicité des HES par fumigation.	96
Figure 29: Photographie du test de préférence de surface utilisé dans l'effet répulsif des HES.	97
Figure 30: Photographie des graines des adventices et herbes cultivées (A : <i>Triticum durum</i> , B: <i>Raphanus sativus</i> , C: <i>Sinapis arvensis</i> , D: <i>Phalaris canariensis</i>).	99
Figure 31: Rendement en HES des différentes parties de <i>P. nigra</i> et d' <i>A. numidica</i>	106
Figure 32: Répartition des familles de molécules présentes dans les HES des aiguilles et des cônes de <i>P. nigra</i> obtenues par hydrodistillation.	114
Figure 33: Répartition des familles de molécules présentes dans les composés volatiles des aiguilles et des cônes de <i>P. nigra</i> obtenues par SPME.	118
Figure 34: Diversité des familles de molécules présentes dans les HES des cônes de <i>P. nigra</i>	128
Figure 35: Diversité (%) des groupements fonctionnels des composés oxygénés présents dans les HES des cônes de <i>P. nigra</i>	128
Figure 36: Répartition des familles de molécules présentes dans les HES des différentes parties d' <i>A. numidica</i>	141
Figure 37: Diversité (%) des composés majeurs des HES des différentes parties d' <i>A. numidica</i>	142
Figure 38: Diversité (%) des groupements fonctionnels des composés oxygénés des trois parties d' <i>A. numidica</i>	142
Figure 39: Activité antioxydante totale des HES de <i>A. numidica</i>	157
Figure 40: Activité antioxydante totale des HES de <i>P. nigra</i>	158
Figure 41: Activité antioxydante totale des HES d' <i>A. numidica</i>	159
Figure 42: Activité antioxydante totale des HES de <i>P. nigra</i>	160
Figure 43: Blanchissement de la β -carotène par les HES de <i>P. nigra</i> et d' <i>A. numidica</i>	162
Figure 44: Variation de la mortalité chez les adultes de <i>C. maculatus</i> par contact, en fonction de la dose d'huiles essentielles de <i>P. nigra</i> appliquée, sur une durée de 4 jours	191
Figure 45: Variation de la mortalité chez les adultes de <i>C. maculatus</i> par contact, en fonction de la dose d'huiles essentielles d' <i>A. numidica</i> appliquée, sur une durée de 4 jours	192
Figure 46: Variation de la mortalité et du pourcentage de mortalité corrigée par fumigation des différentes parties de <i>P. nigra</i>	198

Figure 47: Variation de la mortalité et du pourcentage de mortalité corrigée par fumigationdesdifférentespartiesd' <i>A.numidica</i>	199
---	-----

Listedestableaux

Tableau1 :Positionssystematiquede <i>Pinusnigrassp.mauretanica</i>	55
Tableau2 :Positionssystematiqued' <i>Abiesnumidica</i>	59
Tableau3 :Caractérisationdessitesderécolte:Coordonnéesgéographiquesetdatesderécoltedespartiesvégétalesdesespècesétudiées	81
Tableau 4 : Propriétés physicochimiques des huiles essentielles des trois parties de <i>P. nigra</i> etd' <i>A.numidica</i>	109
Tableau 5 :Composition chimique des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation desaiguillesetdesbranchesde <i>Pinusnigrassp.mauretanica</i> (Mair.&Pey.)(Pinaceae).	111
Tableau 6 :Composition Chimique des composés volatiles des aiguilles et des branches de <i>P.nigrassp.mauretanica</i> obtenuesparSPME.	116
Tableau 7 :Diversité de la composition chimique (chimiotype) des huiles essentielles de <i>P.nigra</i> enfonctiondel'organe,dupayssetde sous-espèce.	120
Tableau8 :CompositionchimiquedesHesdesconesde <i>Pinusnigrasp.mauretanica</i> (Mair.&Pey.)(Pinaceae).....	125
Tableau9 :Diversité deschématypes(composésmajoritaires) isolésdesHESdes cônesdedifférentesespècesdegenrePinus.....	131
Tableau10 :CompositionchimiquedesHesdesdifférentespartiesd' <i>Abiesnumidica</i> DeLannoyexCarrière(Pinaceae)dedjebelTababourt	136
Tableau11 :ActivitéinhibitriceduDPPH [•] desHESde <i>P.nigra</i> etd' <i>A.numidica</i>	153
Tableau12 :Activitéinhibitricedel'ABTS ^{•+} desHESde <i>P.nigra</i> etd' <i>A.numidica</i>	156
Tableau13 :Activitéinhibitrice(%)delacholinestérase(AChEetBChE)desHESde <i>P.nigra</i> et d' <i>A. numidica</i>	163
Tableau14 :Activitésantibactériennes(diamètresdeszonesd'inhibition)desHESde <i>P.nigra</i> etdel'ampicilline(antibiotiquederéférence).....	173
Tableau 15 :Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles <i>P. nigra</i> contrelessouchesbactériennestestées.....	174
Tableau16 :Activitésantibactériennes(diamètresdeszonesd'inhibition)desHESd' <i>A.numidica</i> etdel'ampicilline(antibiotiquederéférence)	178
Tableau17 :Concentrationminimaleinhibitrice(CMI)deshuilesessentiellesd' <i>A.numidica</i> contrelessouchesbactériennestestées.....	179
Tableau18 :ActivitéantifongiquesdesHESdesdifférentsorganesde <i>P.nigra</i>	183
Tableau19 :ActivitéantifongiquesdesHESdesdifférentsorganesd' <i>A.numidica</i>	184

Listedestableaux

Tableau 20 : Toxicité comparée (effet contact) des HEs extraites des différentes parties de <i>P. nigra</i> et d' <i>A. numidica</i>	193
Tableau 21 : Toxicité comparée (inhalation) des HEs extraites des différentes parties de <i>P. nigra</i> et d' <i>A. numidica</i>	200
Tableau 22 : Pourcentage de répulsion en fonction de la dose et répulsivité moyenne des HEs de <i>P. nigra</i> et d' <i>A. numidica</i>	204
Tableau 23 : Effet des HEs de <i>P. nigra</i> et d' <i>A. numidica</i> sur la capacité germinative (%) des différentes adventices et semences étudiées	212
Tableau 24 : Effets du traitement en HEs sur la fuite relative en électrolytes des feuilles des adventices et des graines cultivées.	220
Tableau 25 : Teneurs (nmol/g MF) et évolution du MDA dans les feuilles des plantes traitées par les différentes HEs étudiées	224
Tableau 26 : Teneurs (nmol/g MF) et évolution de H ₂ O ₂ dans les feuilles des plantes traitées par les différentes HEs étudiées	228
Tableau 27 : Effets des différentes HEs étudiées sur l'accumulation de la proline dans les feuilles des plantes testées	231
Tableau 28 : Effet des HEs sur la teneur en chlorophylle totale (µg / g de feuilles) des plantes étudiées.	234
Tableau 29 : Effets des HEs sur la teneur relative en eau chez les plantules étudiées.	237

Listed'abréviation

A

AA:AcideAscorbique

AAT:Alcoolacétyl transférase

ABTS : Ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonique)

AFNOR : Association Française de Normalisation

B

BN:Bouillon nutritif

C

CI₅₀:Concentrationinhibitriceà50%

CLA:CarnationLeafAgar

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG:ChromatographieenPhaseGazeuse

CPG/SM: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectrométrie de Masse

CS-CO₂:CO₂subcritique

¹³C-RMN : Résonance magnétique nucléaire du ¹³C

D

DL₅₀:Doseléthalequitue50%d'individus de la population traitée

DL₉₅: Dose létale qui anéantit 50% d'individus

DMAPP:Diméthylallyldiphosphate

DMSO:Diméthylesulfoxyde

DPPH:1,1-diphényl-2-picryl-hydrazil

DXP:1deoxy-D-xylulose-5-phosphate

F

FID:DétecteuràIonisationde Flamme

FPP:Farnésyl diphosphate

G

GC-EIMS: Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse à impact électronique

GGPP: Géranyl géranyl diphosphate

GPP:Géranyldiphosphate

H

HD : Hydrodistillation

HE : Huile essentielle

HEs:Huileessentielles

HMG-CoA : Hydroxy-méthylglutaryl-CoA

HS-SPME:Headspace(HSespacedetête) etmicro-extractionenphasesolide(SPME) *J*

IE:impactélectronique

IPP:Isopentenyl diphosphate

Ir:indicesderétention

M

MDA:Malondialdéhyde

MPE:2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate

MVA:Mévalonateacide

P

PDA:PotatoDextrose Agar

PMF:Forcemotricedes protons

S

SPME:Micro-ExtractionenPhaseSolide

Listed'abréviation

T

TBA:AcideThiobarbiturique

TCA:AcideTrichloracétique

TPS : Terpènes Synthases**TR**

: Temps de rétention

U

UICN : Union International pour la
Conservation de la Nature

Introduction

La région de Kabylie possède une flore riche, soulignée par plusieurs points chauds de biodiversité, faisant d'elle l'un des principaux centres de diversité des espèces végétales du pays (Vela et Benhouhou, 2007). De plus, cette région abrite l'une des plus grandes couvertures forestières du pays, où poussent naturellement des arbres uniques tels que *Pinus nigra*, *A. numidica*...etc, des espèces gravement menacées par la perte de leur habitat (Liste rouge de l'Union internationale de la Conservation de la Nature).

L'acquisition de connaissances scientifiques sur ces espèces n'est pas seulement importante pour concevoir des stratégies de conservation (restauration des habitats), mais aussi pour l'utilisation durable de leurs produits non ligneux, y compris les huiles essentielles, qui peuvent présenter différentes activités biologiques. Outre notre intérêt pour la recherche de composés bioactifs de grande valeur, l'acquisition de données sur les profils chimiques de ces espèces charismatiques pourrait contribuer à une meilleure compréhension de la phylogénie de ces taxons. En effet, les liens entre les chémotypes et la diversité génétique des populations naturelles d'espèces étroitement liées sont de plus en plus étudiés grâce à des approches modernes telles que la chémosystématique (Adams et al., 2003 ; Zhang et al., 2022 ; Chung et al., 2023).

Les huiles essentielles revêtent un intérêt considérable dans la préservation de la biodiversité en raison de leurs propriétés multifonctionnelles (D'Amelia et al., 2021; Bolouri et al., 2022). D'une part, elles peuvent être utilisées comme alternatives naturelles aux pesticides chimiques dans l'agriculture biologique (Raveau et al., 2020; Chang et al., 2022). En réduisant la dépendance aux produits chimiques nocifs, elles préservent les écosystèmes en minimisant la pollution et la détérioration des sols. D'autre part, les huiles essentielles ont des propriétés antifongiques, antibactériennes et insecticides (Hou et al., 2022 ; Campolo et al., 2018) qui peuvent être utilisées pour protéger les cultures et les forêts contre les ravageurs et les pathogènes, limitant ainsi les pertes de biodiversité causées par ces menaces. De plus, l'utilisation de ces composés naturels dans la médecine traditionnelle (Lis-Balchin, 1997) et la recherche pharmaceutique (Cimino et al., 2021) encourage la préservation des plantes qui les produisent, contribuant ainsi à la protection des espèces végétales menacées. L'exploitation durable des plantes à des fins d'extraction d'huiles essentielles peut également fournir une incitation économique à la conservation des habitats naturels, garantissant ainsi un équilibre entre les besoins humains et la préservation de la biodiversité (Hamdane et al., 2023; Marcilino et al., 2023). Egalement, ces métabolites offrent, une approche holistique pour la conservation de la biodiversité en favorisant des pratiques agricoles et pharmaceutiques

respectueuses de l'environnement tout en valorisant les écosystèmes et les plantes qu'elles abritent (Kay *et al.*, 2023). Leurs caractéristiques chimiques complexes et variées, illustrent parfaitement l'aspect chémogénétique fascinant des plantes, d'où "Chaque huile essentielle est une véritable signature chimique de la plante dont elle est extraite".

La production et la caractérisation des huiles essentielles, le contrôle de leur qualité tout autant que la mise en évidence d'une éventuelle spécificité nécessite la mise en œuvre des méthodes de préparation et d'analyses les plus modernes. L'analyse des profils chimiques en HE extraites des organes d'une plante offre des clés essentielles pour comprendre son écologie, sa physiologie, et sa capacité à survivre dans son habitat naturel, ce qui peut orienter les efforts de conservation biologique visant à protéger ces espèces vitales pour notre biodiversité globale. En examinant la variation de la composition chimique en HEs de ses organes, les résultats peuvent non seulement mieux comprendre les adaptations de la plante à son environnement, mais également identifier des mécanismes de défense naturelle. Ces mécanismes incluent la production de composés chimiques qui repoussent les herbivores, les pathogènes, ou qui favorisent la pollinisation. De plus, en étudiant la composition chimique des organes, il est possible de développer des stratégies de conservation spécifiques pour préserver les populations de plantes menacées (Cragg & Newman, 2005 ; Mishra & Tiwari, 2011).

Le regain d'intérêt pour l'utilisation et la consommation de produits "bio", a conduit les scientifiques à s'intéresser aux huiles essentielles et en particulier aux activités biologiques de leurs constituants. Ces composés présentent l'intérêt d'avoir une faible toxicité (Prakash *et al.*, 2023), d'être facilement acceptés par les consommateurs et d'avoir un potentiel multi-usage important. Si les propriétés antimicrobiennes sont reconnues depuis la fin du 19^{ème} siècle, ce n'est que récemment que des études ont montré les activités antivirales, antimitotiques, antioxydantes, antiparasitaires, ou encore insectifuges des huiles essentielles. Avec la résistance accrue des bactéries aux antibiotiques, les constituants des huiles essentielles apparaissent comme des produits de substitutions très intéressants (Faleiro & Miguel, 2013). Il est donc indispensable de chercher des agents actifs contre les bactéries résistantes. De plus, la sécurité alimentaire est l'une des plus importantes préoccupations de santé publique. Des études montrent que 30% de la population des pays industrialisés souffrent d'intoxications alimentaires dues à la présence de micro-organismes au sein des aliments (Abebe *et al.*, 2020).

Par ailleurs, l'oxydation des lipides observée pendant le traitement et le stockage des produits alimentaires (Geng *et al.*, 2023) est responsable de la détérioration de la qualité des aliments et surtout est néfaste pour la santé humaine. L'utilisation d'antioxydants

synthétiques, tels que les dérivés du toluène ou de l'anisole, utilisés pour permettre une meilleure conservation de l'aliment est limitée du fait de leurs propriétés cancérigènes. Les huiles essentielles peuvent donc jouer un rôle important et nouveau dans la préservation de la qualité des produits de l'industrie alimentaire (Horbańczuk *et al.*, 2019; Lourenço *et al.*, 2019).

Dans le cadre de l'implémentation des approches envisagées, notre attention s'est portée sur l'évaluation phytochimique des huiles essentielles extraites de deux espèces de la famille des Pinaceae, lesquelles sont répertoriées comme espèces vulnérables par l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN). La préférence accordée à cette famille végétale repose sur sa réputation d'abondance en composés volatils. La sélection de cette famille botanique s'est justifiée par sa réputation en matière de richesse en huiles essentielles. Dans cette optique, nous avons procédé à l'extraction des huiles essentielles présentes dans leurs parties aériennes (feuilles, branches et cônes), suivie d'une caractérisation approfondie et d'une analyse des variations chimiques de ces substances. Ensuite, nous avons recherché une valorisation des huiles essentielles étudiées en développant une approche pluridisciplinaire chimie/activité biologique au travers de la mise en évidence des activités biologiques des huiles essentielles.

Ce manuscrit, illustre le déroulement cohérent de notre investigation et présente de manière concise et précise les résultats de notre approche analytique. Il est structuré en trois chapitres.

Le premier, est un état de l'art des connaissances bibliographiques sur notre projet de recherche. La première partie de ce chapitre présente les contours scientifiques de la recherche sur les huiles essentielles. La seconde, quant à elle, décrit l'aspect botanique, taxonomique, recherche de molécules à intérêt pharmaceutique et autres des espèces objet de notre recherche ;

Dans le deuxième chapitre, nous exposons le matériel utilisé et la méthodologie retenue pour répondre aux questions posées ;

Dans le troisième chapitre, nous regroupons les résultats et discussions relatifs aux expérimentations menées dans le cadre de ce travail.

En conclusion, le manuscrit se termine par une synthèse des résultats clés et propose des pistes pour de futurs travaux phytochimiques sur les espèces étudiées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abebe E., Gugsu G. and Ahmed M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 2020, 4674235.
2. Adams R.P., Schwarzbach A.E. and Pandey R.N. (2003). The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers, and ITS sequence data sets among genotypes: an example from *Juniperus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 (4), 375-387.
3. Bolouri P., Salami R., Kouhi S., Kordi M., Asgari Lajayer B., Hadian J. and Astatkie T. (2022). Applications of essential oils and plant extracts in different industries. *Molecules*, 27 (24), 8999.
4. Campolo O., Giunti G., Russo A., Palmeri V. and Zappalà L. (2018). Essential oils in stored product insect pest control. *Journal of Food Quality*, 2018, 1-18.
5. Chang Y., Harmon P.F., Treadwell D.D., Carrillo D., Sarkhosh A. and Brecht J.K. (2022). Biocontrol potential of essential oils in organic horticulture systems: From farm to fork. *Frontiers in Nutrition*, 8, 805138.
6. Chung M.Y., Merilä J., Li J., Mao K., López-Pujol J., Tsumura Y. and Chung M.G. (2023). Neutral and adaptive genetic diversity in plants: An overview. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1116814.
7. Cimino C., Maurel O.M., Musumeci T., Bonaccorso A., Drago F., Souto E.M.B., Pignatello R. and Carbone C. (2021). Essential Oils: Pharmaceutical Applications and Encapsulation Strategies into Lipid-Based Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 13 (3), 327.
8. Cragg G.M. & Newman D.J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 7-24.
9. D'Amelia V., Docimo T., Crocoll C. and Rigano M.M. (2021). Specialized metabolites and valuable molecules in crop and medicinal plants: The evolution of their use and strategies for their production. *Genes*, 12(6), 936.
10. Faleiro M.L. & Miguel M.G. (2013). Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. In *Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components* (pp. 65-94). Academic Press.
11. Geng L., Liu K. and Zhang, H. (2023). Lipid oxidation in foods and its implications on proteins. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1192199.

12. Hamdane, S., Marcelino, S., Gaspar, P. D., & Paço, A. (2023). Sustainable agricultural practices for the production of aromatic and medicinal plants: Evidences and Recommendations.
13. Horbańczuk O. K., Kurek M. A., Atanasov A.G., Brnčić M. and Rimac Brnčić S. (2019). The effect of natural antioxidants on quality and shelf life of beef and beef products. *Food Technology and Biotechnology*, 57(4), 439-447.
14. Hou T., Sana S.S., Li H., Xing Y., Nanda A., Netala V.R. and Zhang Z. (2022). Essential oils and its antibacterial, antifungal and anti-oxidant activity applications: A review. *Food Bioscience*, 47, 101716.
15. Kayesh E., Gomasta J., Bilkish N., Koly K.A. and Mallick S.R. (2023). A Holistic Approach of Organic Farming in Improving the Productivity and Quality of Horticultural Crops. In Organic Fertilizers-New Advances and Applications. *IntechOpen*.
16. Lis-Balchin M. (1997). Essential oils and 'aromatherapy': their modern role in healing. *Journal of the Royal Society of Health*, 117(5), 324-329
17. Lourenço S.C., Moldão-Martins M. and Alves V.D. (2019). Antioxidants of Natural Plant Origins: From Source to Food Industry Applications. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(22), 4132.
18. Marcelino S., Hamdane S., Gaspar P.D. and Paço A. (2023). Sustainable Agricultural Practices for the Production of Medicinal and Aromatic Plants: Evidence and Recommendations. *Sustainability*, 15(19), 14095.
19. Mishra B.B. & Tiwari V.K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 4769-4807.
20. Prakash B., Singh P. P., Gupta V. and Raghuvanshi T. S. (2023). Essential oils as green promising alternatives to chemical preservatives for agri-food products: New insight into molecular mechanism, toxicity assessment, and safety profile. *Food and Chemical Toxicology*, 114241.
21. Raveau R., Fontaine J. and Lounès-Hadj Sahraoui A. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods* (Basel, Switzerland), 9 (3), 365
22. Véla E. & Benhouhou S. (2007). Évaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *Comptes Rendus Biologies*, 330(8), 589-605.

23. ZhangC.,JiaC.LiuX.,ZhaoH.,HouL.,LiM.,CuiB.andLiY.(2022).GeneticDiversity Study on Geographical Populations of the Multipurpose Species *Elsholtzia stauntonii* Using Transferable Microsatellite Markers. *Frontiers in Plant Science*, 13, 903674.

Revuebibliographique

I. Les substances volatiles : la famille des terpènes

Les huiles essentielles (HEs) existant dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes odeurs qu'elles dégagent. Ce sont des substances volatiles et odorantes obtenues des végétaux par entraînement à la vapeur d'eau. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des mélanges liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie. Les huiles essentielles ont, à toutes époques, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qu'il utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. Les HEs se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : dans les feuilles, dans les fleurs, dans le fruit, dans les graines, dans l'écorce et, pour certaines plantes, au niveau dans les racines (Bakali et al., 2008; Turek and Stintzing, 2013; Ali et al., 2015; Perricone et al., 2015; Thangaleela et al., 2022; Boy et al., 2023).

II. Généralités sur les huiles essentielles

II.1. Définition

Les huiles essentielles sont des substances odorantes concentrées, obtenues à partir de plantes par entraînement à la vapeur d'eau, hydro-distillation ou expression mécanique. Le terme huile essentielle a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse Paracelsus von Hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel (Guenther, 1948). Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (Lawless, 1996; Lis-Balchin, 2006; Turek & Stintzing, 2013).

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : "un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques". Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique et sont, en général, plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes. Ce sont des molécules légères qui sont entraînées par la vapeur d'eau lors de la distillation, l'huile se sépare de l'eau du distillat mais une petite partie persiste dans l'eau et lui communique une odeur, on parle alors d'eau aromatique (Bruneton, 2009; Kaloustian & Hadji-Minaglou, 2012; Dhifi et al., 2016).

Certains auteurs définissent les huiles essentielles comme des assemblages complexes de composés volatils, souvent accompagnés d'une fraction aqueuse résiduelle issue de leur extraction par hydrodistillation. Cette conceptualisation s'étend aux essences extraites par pression à froid des écorces ou zestes des agrumes du genre *Citrus*, où l'eau participe indirectement dans les méthodes mécaniques visant à libérer les substances des cavités soléifères (Garnero, 1998).

Duquénois (1979) met en évidence l'absence d'une définition standardisée des huiles essentielles, notant que la conceptualisation de ces substances diverge en fonction des disciplines professionnelles. Ainsi, botanistes, industriels, parfumeurs et pharmacologues adoptent des définitions qui reflètent les exigences et les applications propres à leurs champs d'expertise.

II.2. Historique

Les épices, valorisées depuis l'antiquité, pour leur arôme, leur goût et leurs capacités de conservation ont précédé la reconnaissance historique des huiles essentielles (Burt, 2004). Parmi celles-ci, l'huile de térébenthine est la seule explicitement citée par les historiens de la Grèce et de Rome antiques (Guenther, 1948). La technique de distillation, initialement mise en œuvre en Orient, notamment en Égypte, en Inde et en Perse, il y a plus de deux millénaires, a été perfectionnée au IX^e siècle par les Arabes (Guenther, 1948). La première documentation fiable sur la distillation des HEs est attribuée à Arnau de Vilanova, médecin Catalan du XIII^e siècle (Guenther, 1948). À cette époque, les HEs étaient déjà produites dans les officines pharmaceutiques et leurs propriétés pharmacologiques consignées dans les pharmacopées (Burt, 2004), mais leur diffusion en Europe ne s'accéléra qu'au XVI^e siècle, période durant laquelle elles étaient activement commercialisées à Londres (Crosthwaite, 1998; Lucchesi, 2005). Au cours de ce même siècle, Brunschwig et Reiff, deux médecins de Strasbourg, ont publié indépendamment des traités sur la distillation et l'usage des HEs, ne recensant qu'un nombre limité de variétés telles que la térébenthine, le genévrier, le romarin, la lavande, le clou de girofle, le macis, la muscade, l'anis et la cannelle (Guenther, 1948).

Au XVII^e siècle, Du Chesne (Quercetanus), un médecin français, rapporte que la préparation des HEs était largement maîtrisée et que les pharmacies disposaient couramment d'une gamme de 15 à 20 huiles différentes (Guenther, 1948). L'huile d'arbre à thé, utilisée à des fins médicinales, est documentée depuis la colonisation de l'Australie à la fin du XVIII^e siècle, bien que son usage par les populations autochtones australiennes soit probablement

antérieur([Carson&Riley,1993](#)). Lapremièreévaluationexpérimentaledeseffetsbactéricides des vapeurs d'HEsaétéréaliséeparDelaCroixen1881([Burt,2004](#)). Toutefois, aucoursdes XIX^e et XX^e siècles, l'application médicale des HEs a progressivement cédé la place à leur utilisation principale pour l'aromatisation et la parfumerie ([Guenther, 1948](#)), marquant un déplacement des pratiques thérapeutiques vers des fins plus commerciales et industrielles.

II.3. Répartitionbotanique,lieuxdeformationetd'accumulation

Les HEs se distinguent par leur présence transversale dans divers organes végétaux, tels que les fleurs, feuilles, graines, racines, rhizomes, fruits, bois et écorces, avec des familles comme les Conifères, Myrtacées, Ombellifères, Labiées et Composées qui en sont particulièrementpourvues([Cavanagh&Wilkinson,2002](#);[Başer&Demirci,2007](#);[Bakkali et al., 2008](#); [Bruneton, 2009](#)).

La biosynthèse et l'accumulation des HEs s'effectuent au sein de cellules sécrétrices spécialisées (**Figure 1**), qui sont des structures histologiques dédiées à ces fonctions. Ces cellules ne sont généralement pas isolées mais organisées en groupements tels que des poches chez les Myrtacées et Rutacées, des canaux sécréteurs chez les Apiacées et Astéracées, ou des poils sécréteurs chez les Lamiacées et Géraniacées. Elles sont principalement situées en périphériedestissusexternesdesplantes, reflétantuneadaptationévolutivepourladispersion des composés volatils ([Svobodaand Svoboda, 2000](#) ;[Bruneton, 2009](#) ;[Kaloustian& Hadji-Minaglou, 2012](#)).



Figure 1 : Photographie de quelques structures histologiques de sécrétion des HEs (A : cavitéssécrétoires;B:glandessécrétricesessilesetdetrichomessécréteurs;C:glandeset trichomes non sécrétoires. Adapté de [Svoboda & Svoboda, 2000](#))

LesstructuresvégétalesimpliquéesdanslaproductiondesHEsvariantencomplexitéselon l'espèce.Chezlesplantesàfleurs, lasynthèseetl'émissiondesHEssontsouventlocalisées

dans des cellules épidermiques coniques, notamment sur les pétales. Les Orchidacées possèdent des osmophores, des cellules spécialisées situées à des emplacements stratégiques pour maximiser l'attraction des pollinisateurs. La rose, en particulier, a été étudiée de manière approfondie pour comprendre le rôle et la caractérisation de ces cellules coniques dans la sécrétion des HEs, servant de modèle pour l'étude des mécanismes de sécrétion pétale- spécifique (Bergougnoux et al., 2007).

De nombreux tissus végétaux possèdent des cavités sécrétrices à la surface de l'épiderme ou à l'intérieur de l'épiderme comme les fruits de Citrus ou les canaux résinifères des conifères (Fahn, 2000). Chez les Gymnospermes, des structures sécrétrices plus ou moins spécialisées ont été décrites. On trouve par exemple chez *Thuja plicata* des cellules sécrétrices isolées réparties dans le bois, chez *Abies grandis* des cellules en forme d'ampoules ou de citernes séparées des autres qui déversent leur sécrétion dans une lumière commune et chez *Picea* sp et *Pinus* sp le tronc et l'écorce comportent de véritables canaux résinifères (Trapp & Croteau, 2001).

11.4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les HEs sont généralement des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluide, voire rétinolides, odorantes, volatiles et inflammables. À température ambiante, elles sont incolores ou jaune pâle, à l'état liquide, mais on peut avoir des huiles essentielles de couleurs bleue tel que le cas des huiles essentielles qui contiennent le chamazulène (*Artemisia absinthium*, *Chrysanthemum* sp.). Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HEs officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HEs de cannelle, de girofle et de safran. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur. Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée. Leur point d'ébullition varie de 160 à 240 °C. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation et à conservation limitée (Bruneton, 2009; Turek & Stintzing, 2013; Yadav, 2022).

11.5. Composition chimique

Les HEs ont une composition assez complexe. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Başer & Demirci, 2007; Bruneton, 2009; Dhifi et al., 2016; Selmi et al., 2022). Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C₅) et comprennent les monoterpènes (en C₁₀), les sesquiterpènes

(C₁₅), les diterpènes (C₂₀) et les triterpènes en (C₃₀). Ils ont la même origine métabolique. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. En général, une HE est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'éther-oxydes et de carbures (Başer & Demirci, 2007 ; Bruneton, 2009; Brahmkshatriya & Brahmkshatriya, 2013 ; Masyita et al., 2022).

La chimie des huiles essentielles est extrêmement complexe. A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques et parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement ; On l'appelle composé majoritaire (Sharifi-Rad et al., 2017; de Sousa et al., 2023). La composition chimique des HE varie selon la partie de la plante utilisée (bois, racine, écorce, fleur, feuille, tige, semence) et la variété (Bruneton, 2009; Butnariu & Sarac, 2018). De plus, une même variété peut produire une huile essentielle très différente, selon les conditions climatiques, géographiques et agronomiques ou elle évolue. Elle varie encore de façon appréciable avec la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (Sangwan et al., 2001; Barra, 2009, Liao et al., 2021). En règle générale, les composants des huiles essentielles se divisent en deux grands groupes : les terpénoides et les composés aromatiques.

II.5.1. Les terpénoides ou terpénoides

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant les squelettes de terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.). Les terpènes sont des hydrocarbures naturels à masse moléculaire peu élevée, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est (C₅H_x)_n dont *x* est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et *n* peut prendre des valeurs de 1 à 8. La molécule de base est l'isoprène de formule C₅H₈ (Singh, 2007; Bruneton, 2009; Brahmkshatriya & Brahmkshatriya, 2013, Yadav et al., 2014)

II.5.2. Biosynthèse des terpènes

II.5.2.1. Origine et diversité des terpènes

La nature produit plus de 60 000 composés isoprénoïdes (également appelés terpènes). Ces molécules représentent la classe la plus ancienne et la plus importante de petites biomolécules, constituant le "terpénome". Elles remplissent une grande variété de fonctions et de propriétés dans tous les organismes vivants, ce qui en fait une ressource incroyablement de produits naturels

([Chang & Keasling, 2006](#)). Ces terpènes, aux structures pourtant si variées, allant d'une simple chaîne linéaire d'hydrocarbures jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés, ont tous en commun plusieurs sous-unités d'isoprène (C_5H_8) d'où l'appellation d'isoprénoides donnée également aux terpènes. Ils sont largement représentés dans les plantes, où ils jouent le rôle d'huiles essentielles, d'insecticides, de pesticides, d'attracteurs de pollinisateurs, d'hormones, d'arômes, de pigments, ... etc. Ces caractéristiques rendent les isoprénoides très attrayants pour des applications dans les industries alimentaire, cosmétique, chimique, pharmaceutique et du caoutchouc ([Berthelot et al., 2012](#)).

La formation du squelette carboné de tous ces terpènes est catalysée par des enzymes ; les terpène synthases (TPS). Ces enzymes sont responsables de la synthèse d'une grande diversité de squelettes carbonés (des terpènes), à partir de l'ionisation de substrats prényl-diphosphates catalysée par la présence de cations métalliques divalents comme le Mg^{2+} ou le Mn^{2+} ([Dewick, 1999](#)) ; elles peuvent facilement acquérir de nouvelles propriétés catalytiques par des modifications mineures de leurs structures ([Keeling et al., 2008](#)).

Ces substrats sont biosynthétisés à partir de précurseurs communs dont le squelette principal à 5 carbones (C_5) : l'isopentenyl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). L'activité de l'IPP isomérase est une étape limitant le rythme de la synthèse des terpénoides. L'IPP et le DMAPP sont en équilibre grâce à la simple activité d'une isomérase ([Berthelot et al., 2012](#)).

La diversité de ces composés repose sur différents facteurs tels que la longueur de la chaîne carbonée, le type de condensation des précurseurs et le type de cyclisation auxquels s'ajoutent des modifications secondaires. Ainsi, les terpènes formés par les TPS sont classés par rapport au nombre d'unités en C_5 qui les constitue. On parle de monoterpènes, sesquiterpènes et diterpènes pour les molécules respectivement en C_{10} , C_{15} et C_{20} (**Figure 2**) formées respectivement à partir des substrats prényl-diphosphates suivants : géranyl diphosphate (GPP), farnésyl diphosphate (FPP) et géranyl géranyl diphosphate (GGPP). Ces précurseurs de terpènes sont synthétisés par des enzymes de la famille des prényltransférases par condensation de l'IPP avec le DMAPP, le GPP ou le FPP. Ainsi, le GPP est formé par une réaction d'ionisation du DMAPP (perte du groupe OPP) suivie d'une réaction de liaison entre le carbone (1) du DMAPP et le carbone (4) de l'IPP, on parle aussi de liaison « tête-queue ». Il en est de même pour le FPP à partir du GPP et pour le GGPP à partir du FPP. Les

molécules formées à partir de ces précurseurs issus de liaison (1-4) sont des terpènes réguliers. Les terpènes irréguliers utilisent les mêmes précurseurs mais sont issus soit de cyclopropanation (c1-2-3), soit de liaison latérale (1– 2), soit de cyclobutanation (c1-2-3-2) (Thulasiram *et al.*, 2008). Parmi les terpènes irréguliers on trouve le squalène et le phytène à l'origine des stérols et des caroténoïdes qui sont tous issus de deux condensations tête-tête puis cyclisation de deux FPP et de deux GGPP, respectivement (Thulasiram *et al.*, 2008).

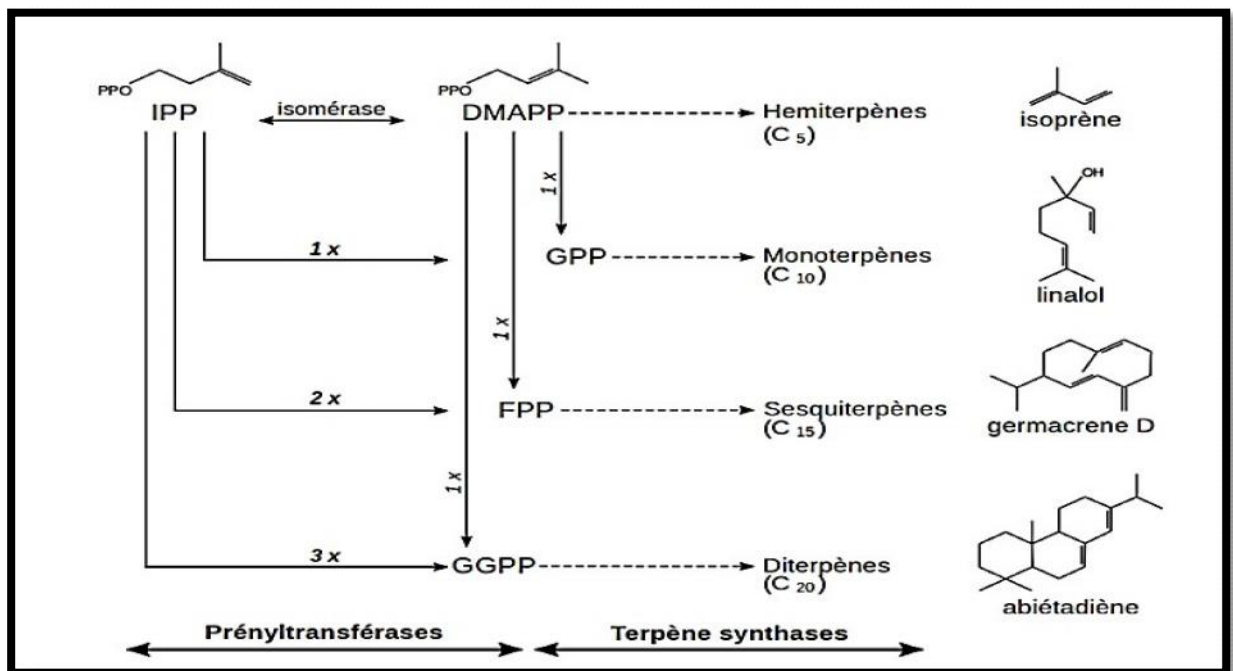


Figure2: Origine structurale des terpènes (Adapté de Başer & Demirci, 2007).

Les TPS catalysent la transformation d'un prényl diphosphate acyclique (GPP, FPP) en une multitude de formes acycliques, mono ou polycycliques (Degenhardt *et al.*, 2009). Pour les monoterpènes, les formes les plus communes sont les monoterpènes acycliques comme le linalol, les monoterpènes cycliques avec un cycle à 6 carbones, comme le limonène et les monoterpènes bicycliques comme les pinènes. Par ailleurs, il existe des monoterpènes hétérocycliques appelés iridanes ayant un cycle à 5 carbones (Hallahan, 2000). Pour les sesquiterpènes les formes les plus communes sont acyclique, mono-, bi- et tricyclique (Dudareva *et al.*, 2006 ; Fraga, 2008).

En conclusion, la grande diversité des terpènes s'explique par les nombreuses possibilités de réarrangements des chaînes carbonées qu'ils constituent. Elles s'expliquent également par les modifications secondaires (acétylation, méthylation, oxydation, hydroxylation, réduction...) que ces molécules peuvent subir après leur formation sous l'action d'autres familles d'enzymes.

Ainsi, chez le fraisier, l' α -pinène est modifié par un cytochrome P450 hydroxylase en myrténol puis ce dernier est transformé en acétate de myrtényl par une alcool acétyl transférase (AAT) (Aharoni et al., 2004). Ces modifications aboutissent généralement à une augmentation de la volatilité et une variation des propriétés olfactives des composés.

II.5.2.2. Les voies de synthèse de l'IPP et leur compartimentation

Selon Başer & Demirci en 2007, la biosynthèse des terpénoïdes ; biogénétiquement, résultent de deux parties simples à cinq-carbone : Isoprenyldiphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyldiphosphate (DMAPP) qui servent d'universel précurseurs pour la biosynthèse des terpènes.

Ce mécanisme considère l'acide mévalonique ou le mévalonate comme précurseur universel des terpènes. Dans les plantes, le diphosphate d'isopentényle (IPP) et le diphosphate de diméthylallyle (DMAPP) peuvent être synthétisés par deux voies compartimentées. La voie de l'acide mévalonique de la biosynthèse des terpénoïdes opère dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (Hemmerlin et al., 2003; Simkin et al., 2011; Lange & Ahkami, 2013). Trois acétylcoenzyme A forment l'acide mévalonique (MVA) ; suite à la réaction de deux molécules d'acétyl-CoA qui donne l'acétoacétyl-CoA, lequel en fixant une troisième molécule d'acétyl-CoA forme l'hydroxy-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Par la suite, la réduction en alcool du carboxyle combiné au CoA conduit à la formation de MVA ; et ce via la voie du mévalonate qui se trouve dans le cytoplasme et qui est responsable de la biosynthèse de la plupart des sesquiterpénoides (Figure 3).

Il y a 20 ans de cela, il a été mis en évidence l'existence d'une autre voie qualifiée de non mévalonate ou voie de deoxyxylulose phosphate (mévalonate indépendant), qui se limite aux chloroplastes ou plastidies liant les monoterpènes et/ou les diterpènes qui sont synthétisés via cette voie (Figure 4). En menant l'IPP et DMAPP ; impliquant 1 deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) et 2C-méthyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP). Elle débute suite à la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde phosphate donnant naissance au DXP. Suite à une panoplie de réaction, l'IPP et DMAPP sont formés, respectivement. L'IPP et DMAPP forment le geranylpyrophosphate (GPP), qui est considéré comme étant un précurseur des monoterpènes. Le nerylpyrophosphate (CN) obtenu à partir de GPP engendre un éventail de squelettes acycliques, cycliques, bicycliques ou tricycliques.

Lesréactionscomme,l'oxydation,laréductionetl'hydratationparl'intermédiairededivers terpènes cyclases ont pour conséquence la formation de nombreux dérivés de terpène. La condensation de GPP et d'IPP donne le farnesylpyrophosphate (FPP), Qui est un précurseur immédiat des sesquiterpenoides. Ainsi que, la condensation du FPP avec l'IPP favorise la formationdugeranyl-geranylpyrophosphate(GGPP)quiestconsidérécommeétantlepointdu départ de toutes formes ditérpiniques.

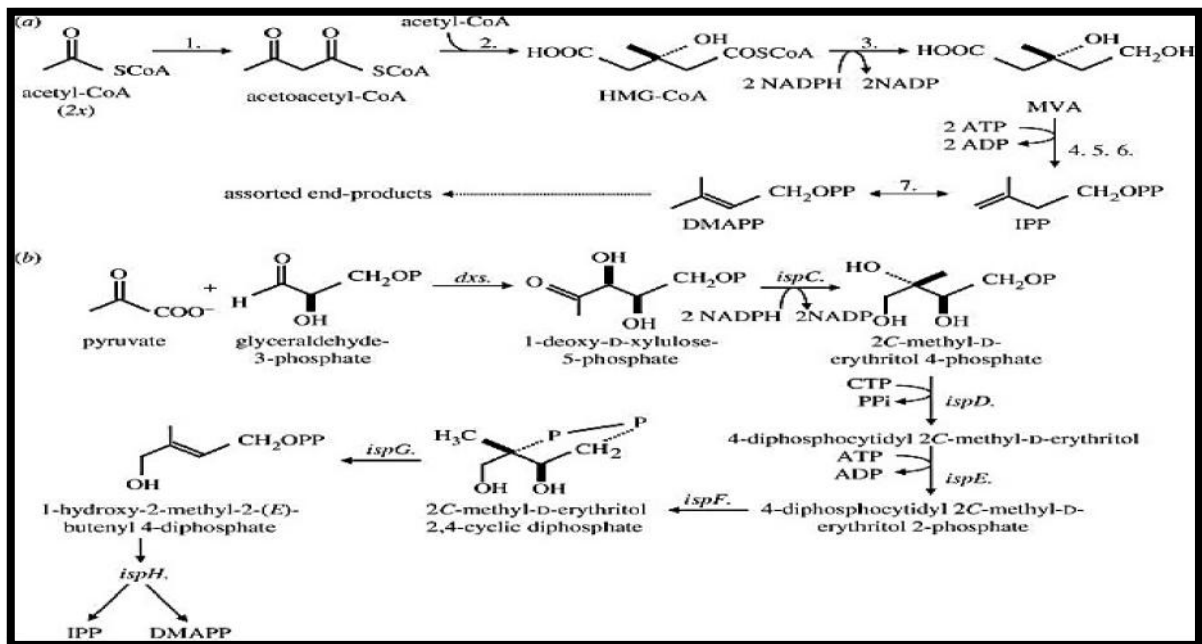


Figure3: Lesvoiesdesynthèsedel'IPPetleDMAPP(AdaptédeRoberts,2007)

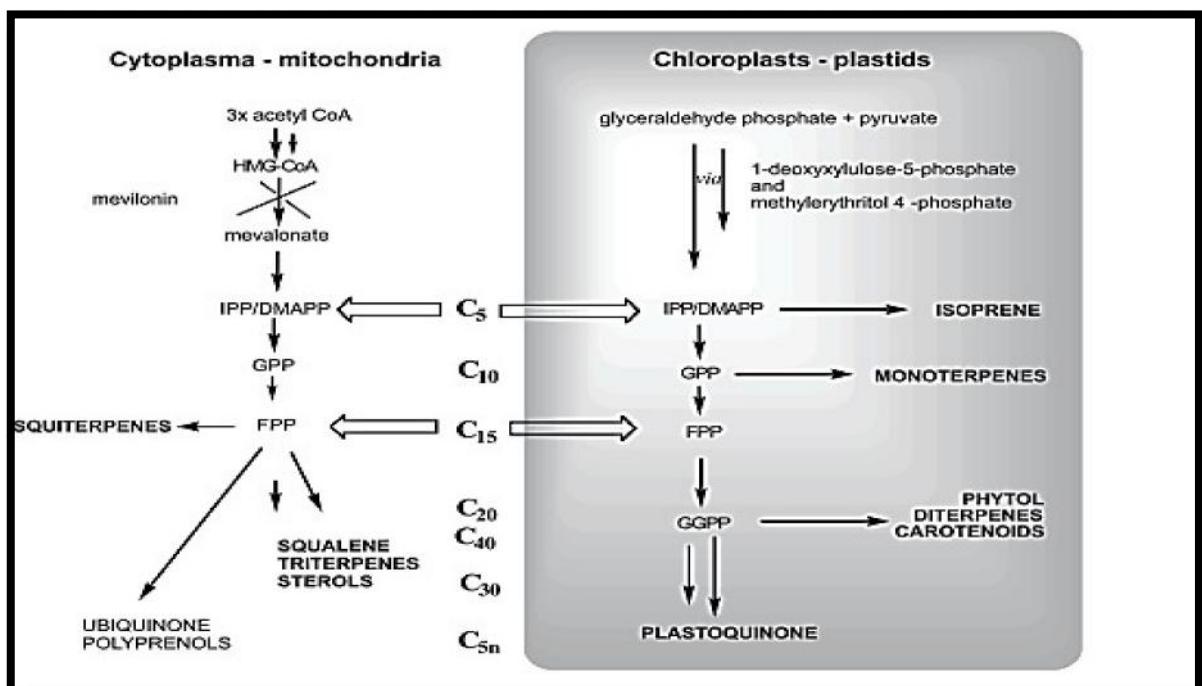


Figure4: Sitesdebiosynthèsedesterpénoïdes(AdaptédeBaşer&Demirci,2007)

Deux voies cellulaires distinctes sont impliquées dans la synthèse de l'IPP et du DMAPP (**Figures 4 et 5**). La voie cytosolique du mévalonate (MVA) à partir de l'acétyl-CoA, et la voie plastidiale du 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) à partir du 1-déoxyxylulose 5-phosphate. Bien que ces voies métaboliques soient séparées, des échanges d'IPP entre les plastes et le cytosol se produisent, régulés notamment par l'exposition à la lumière ([Roberts, 2007](#)).

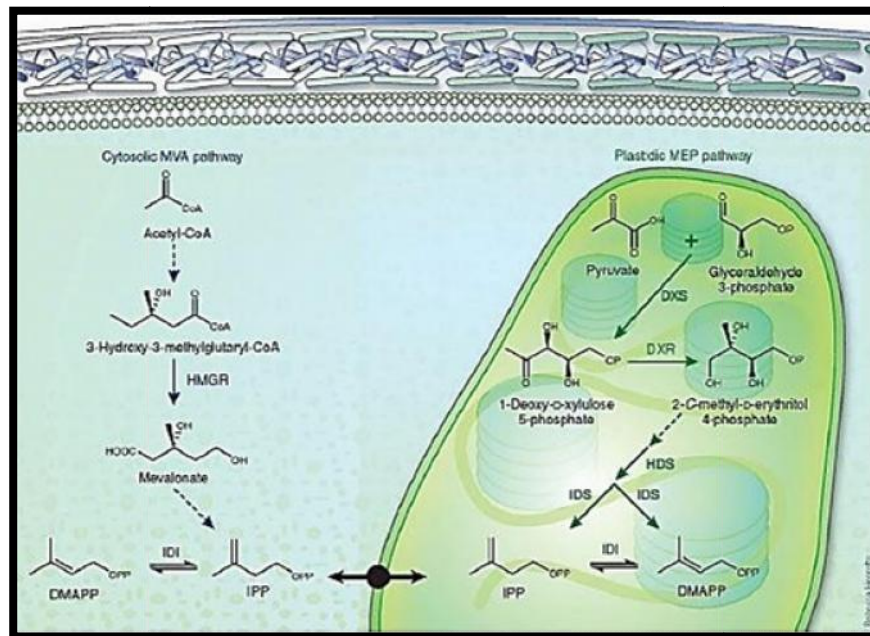


Figure 5: Compartimentation des voies de synthèse de l'IPP et de DMAPP.

[par la voie cytoplasmique (Voie MEV). HMGR : 3-Hydroxy,3-méthylglutaryl coenzyme A réductase ; IDI : isopentenyl diphosphate isomérase. Par voie chloroplastique (voie MEP). DXS : 1-déoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase ; DXR, 1-déoxy-d-xylulose-5-phosphate réductoisomérase ; HDS : hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate synthase. IDS : isopentenyl diphosphate diméthylallyl diphosphate synthase.](Adapté de [Roberts, 2007](#)).

II.6. Classification des terpènes

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires avec les flavonoïdes et les alcaloïdes. Les terpènes peuvent être regroupés en classes en fonction du nombre d'unités isoprènes (n) dans la molécule : hémiterpènes (C_5H_8), monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), diterpènes ($C_{20}H_{32}$), triterpènes ($C_{30}H_{48}$), tétraterpènes ($C_{40}H_{64}$) et polyterpènes ($(C_5H_8)_n$).

II.6.1. Leshémiterpènes

Ce sont les terpènes les plus simples. Le nombre d'aglycones d'hémiterpènes connus est inférieur à 100. La plupart d'entre eux se présentent sous forme d'huiles et sont pour la plupart insolubles dans l'eau, mais certaines molécules contenant des sucres sont solubles dans l'eau (Croteau & Johnsos, 1985). Ces composés peuvent être trouvés dans différentes parties de la plante. L'hémiterpène le plus connu est l'isoprène, qui est l'unité de base de tous les terpènes (Bruneton, 2009). Les acides tiglique, caféique et isovalérique sont des exemples d'hémiterpènes bien connus que l'on trouve chez les plantes (Croteau & Johnsos, 1985).

II.6.2. Lesmonoterpènes

Ils sont très diversifiés et sont présents chez les angiospermes monocotylédones et dicotylédones, les champignons, les bactéries et les gymnospermes. Ils possèdent deux unités isoprénoïdes. Ces sont des composés odoriférants qui expliquent en partie l'odeur de nombreuses fleurs et de nombreux fruits. Ils comprennent des formes acycliques, monocycliques et bicycliques (Figure 6). Ces sont des composants des huiles essentielles qui donnent aux plantes leur arôme et leur saveur et qui sont essentiels pour toute une série d'ingrédients actifs destinés à des applications agricoles, pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Dans chaque groupe, les monoterpénoïdes peuvent être de simples hydrocarbures insaturés ou comporter des groupes fonctionnels et être des alcools, des aldéhydes et des cétones... etc (Singh, 2007; Kang & Lee, 2016).

a. Les phénols: ce sont des molécules anti-infectieuses puissantes qui tuent directement les bactéries par destruction de leur membrane cellulaire. De puissants sénergisants, très acides et doués de bonnes propriétés bactéricides, virucides et fongicides tels que le thymol et l'eugénol.

b. Les aldéhydes: ils sont de deux types; aromatiques et terpéniques. Les premiers ont des propriétés et des effets secondaires identiques aux phénols, tandis que les seconds sont des calmants, des anti-inflammatoires et antalgiques.

c. Les cétones: Ces sont des composés très actifs à faibles doses. Les cétones sont calmantes et sédatives. A forte doses, elles sont neurotoxiques, épiléptisantes. Elles sont faiblement antiseptiques mais surtout immunostimulantes et cicatrisantes comme le menthol, le camphre...

d. Les alcools: Ces sont des immunostimulants. Ils possèdent d'excellentes propriétés anti-infectieuses, bactéricides, virucides et fongicides.

e. Les acides: Ils sont généralement présents à l'état de traces dans les huiles essentielles, et souvent sous la forme combinée d'esters. Etant très solubles, les acides se trouvent davantage dans les eaux de distillation (hydrollats) comme l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.

f. Les esters: Ils ont une action antispasmodique et calmante comme le 4-acétate de linalyle. Ils agissent surtout sur le système nerveux et sont considérés préférentiellement comme antispasmodiques mais aussi comme rééquilibrants nerveux.

g. Les oxydes: Certains jouent un rôle majeur dans les arômes des fruits (oxyde de roses, oxyde de linalol).

II.6.3. Les sesquiterpènes

Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules (**Figure 1c**). Le sesquiterpène est un composé naturel abondant avec le 3-isoprène (**Ashour et al., 2018**). Ils partagent la même classification cyclique que les monoterpènes, à l'exception de quelques terpènes tricycliques. La diversité des terpènes provient de l'arrangement des squelettes à 15 carbones, de la superposition des groupes fonctionnels et des substituants sur leur colonne vertébrale (**Mander & Liu, 2010**). Certains membres sont des hydrocarbures (humulène, farnésène), des aldéhydes (farnésal et lèpidozenal), des dérivés oxygénés de l'hydroxyle ou du carbonyle, et des esters (toriline et éjaponines). Certains sont également des alcools, comme le δ -elemanol et le β -germacrénol. Ce sont des agents antimicrobiens, antifongiques, antitumoraux et anti-inflammatoires. Ils ont de nombreuses applications dans la défense des plantes contre les herbivores et sont des constituants actifs dans l'industrie de la parfumerie (**Li et al., 2019**).

a. Les sesquiterpènes acycliques: Ils sont susceptibles d'être dérivés de trans-farnésyl pyrophosphate (FPP) qui constitue l'analogue de la génération des monoterpènes acycliques à partir de GPP. Généralement tous les monoterpènes acycliques ont un analogue sesquiterpène direct.

b. Les sesquiterpènes monocycliques: Les sesquiterpènes monocycliques sont divisés principalement en 4 familles : bisabolan, germacran, elemannanthumulan. Le zingibérène est un exemple de la famille du Bisabolan que l'on retrouve par exemple dans l'essence de Gingembre.

c. Les sesquiterpènes polycycliques: Parmi les sesquiterpènes polycycliques, le caryophyllène est le plus important, que l'on rencontre principalement dans le poivre, certaines épices et la majorité des résineux.

II.6.4. Lesditerpènes

LesditerpènesontdeshydrocarburesC₂₀nonvolatils,dérivésdequatreunitésisoprènes, dontlastructureesttrèsvariée(**Bhat&al.,2005**);ilsseformentàpartirdeleurprécurseur,le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP). Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines ou les gibbérellines, ainsi que dans les champignons. Ils comprennent des formes linéaires, bicycliques, tétracycliques, pentacycliques ou macrocycliques.Ilexisteenviron2700diterpènesdanslanaturedontlamajoritéestsousforme cyclique. Parmi les diterpènes linéaires, on rencontre la famille Phytane dont le phytol est le représentant le plus connu dans la chlorophylle ou dans les vitamines K et E. Les diterpènes sont caractérisés par des groupes céto et hydroxyle polyoxygénés (**Kang & Lee, 2016**). Les diterpènes provenant de diverses sources ont montré des effets inhibiteurs contre les microbes pathogènes, les ravageurs herbivores et les mauvaises herbes. Ces activités biologiques prometteuses les placent parmi les métabolites secondaires agricoles essentiels ayant un potentiel dans la production de biopesticides (**De Sousa et al., 2018**).

II.6.5. Lessesterpènes

Les sesterpénoïdes sont rares dans la nature et sont formés à partir du précurseur FGPP. On les trouve généralement dans les cires protectrices des insectes et des champignons (**Bhat et al.,2005**).Ilyaplusde150sesterpènesbienconnus,parmilesquelsunetrentaineayantune structure de furfurane, dérivé du 3,7,11,15,19-Pentaméthyleicosane. A titre d'exemple, nous citonslegenepolidequiestunsesterpeney-lactonequiaétéisolépourlapremièrefoisen2009 à partir des feuilles d'*Artemisia umbelliformis* (**Appendino et al., 2009**).

II.6.6. Les triterpènes

Les triterpénoïdes sont des hydrocarbures en C₃₀biosynthétisés à partir de six unités d'isoprèneoùilspartagentleprécurseuracycliquesqualène.Lesnombreuxmodesdefermeture possiblesdusqualènepermettentdeproduireungrandnombredetriterpénoïdesprésentantune grande diversité de structures squelettiques. Le squalène lui-même est un antioxydant naturel et est utilisé commercialement dans les cosmétiques, la nutrition et les vaccins. Les triterpénoïdes peuvent être classés en deux groupes principaux : le type stéroïdien (C₂₇) avec 27 atomes de carbone présents dans le squelette et le type pentacyclique (C₃₀). Le cholestérol estunexempledetriterpénoïdestéroïdienetl'hopaneestuntriterpénoïdepentacyclique(**Bhat &al., 2005**).

La plupart des triterpènes sont des alcools, sous forme libre ou glycoside (les saponines) ou ester. Les triterpènes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux. La vitamine D₂ est un produit dérivé de triterpène ([Thimmappa et al., 2014](#)).

II.6.7. Les tétraterpènes

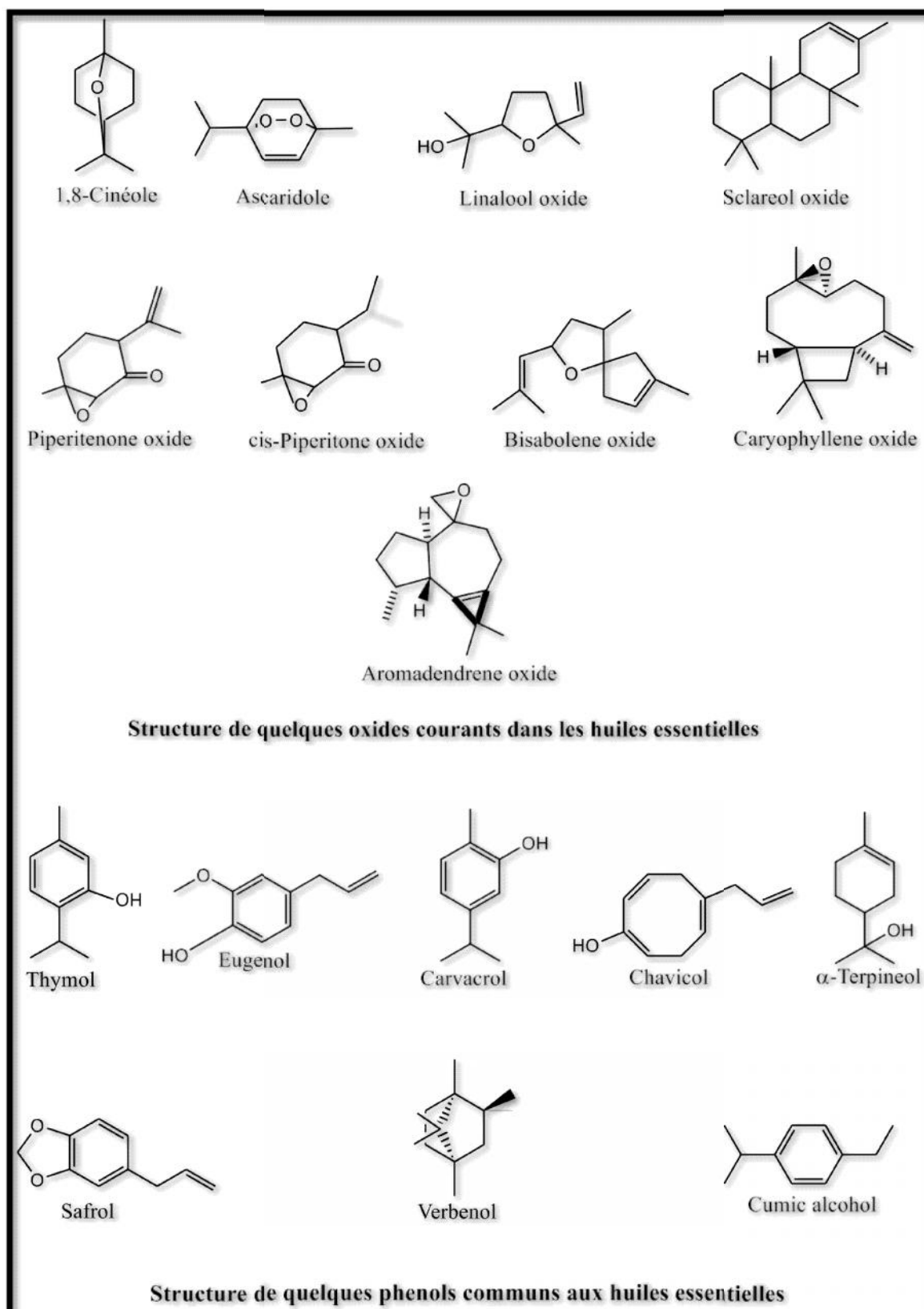
Les tétraterpènes (caroténoïdes) sont des unités 8-isoprènes constituées (C₄₀) de formules moléculaires C₄₀H₆₄ ([Takaichi, 2013](#)). Les caroténoïdes sont les tétraterpènes les plus étudiés, avec plus de 750 membres ([Maoka, 2020](#)). Les plantes terrestres, les algues et les cyanobactéries produisent toutes des tétraterpènes. Leurs rôles biologiques comprennent le piégeage de la lumière, la fonction antioxydante et la protection des plantes contre les radicaux libres. Ils sont également impliqués dans la synthèse des hormones végétales et forment les composants structurels des membranes cellulaires. Ils sont des ingrédients actifs dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire ([Sozer et al., 2010](#) ; [Domonkos et al., 2013](#)).

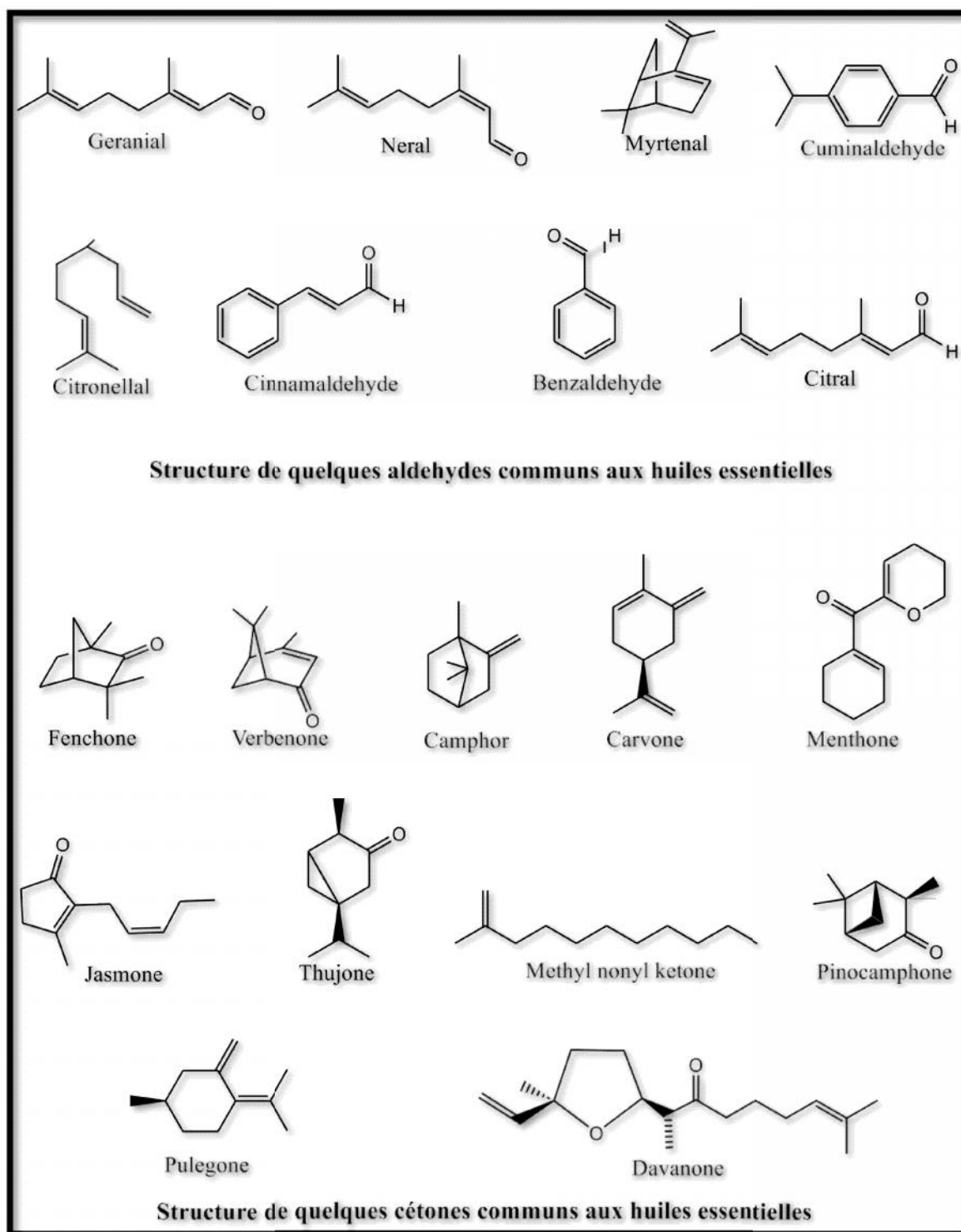
II.6.8. Les composés aromatiques

Sont beaucoup moins fréquents que les monoterpènes et les sesquiterpènes. Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane (C₃-C₆) sont très souvent des allyles et propenylphenols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae telle que l'eugénol et l'apiol ([Bruneton, 2009](#)).

II.6.9. Les composés d'origine diverses

Les huiles essentielles peuvent aussi renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînés lors de l'hydrodistillation comme des carbures, des acides (C₃ à C₁₀), des alcools, des esters, des lactones ([Bruneton, 1999](#)).





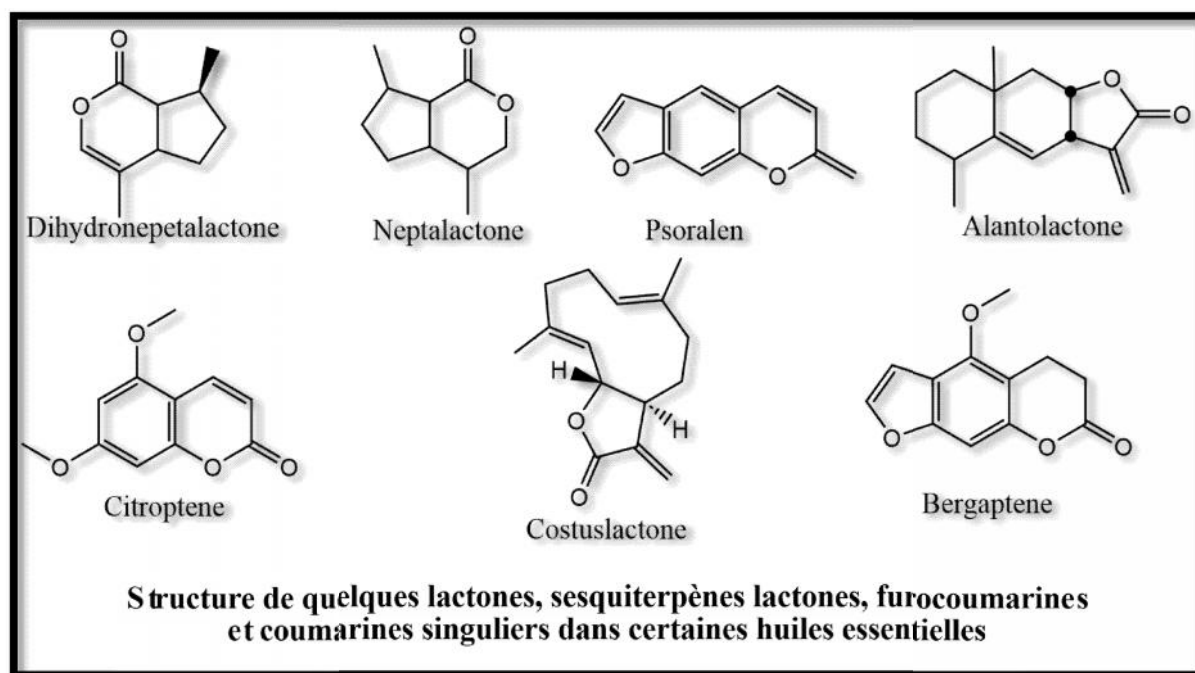


Figure6:StructuredequelquesterpènescommunsauxHEs

11.7. Rôledeshuilesessentiellesdansle végétal

Diverseshypothèsesontétéavancéesquantauroledeshuilesessentielles.Laplusancienne suggérait qu'elles étaient des produits métaboliques dépourvus d'intérêt biologique. Au cours du XXème siècle, plusieurs suppositions ont émergé ([Croteaux, 1986](#) ; [Bruneton, 1999](#)).

Les huiles essentielles agissent comme système de défense contre divers prédateurs tels que les microorganismes, les champignons, les insectes et les herbivores, influençant leurs interactions avec les plantes. Les constituants de ces huiles, jouent un rôle de régulation dans les réactions d'oxydation intramoléculaire, assurant ainsi une protection contre les agents atmosphériques. De plus, certains de ces composés pourraient servir de source d'énergie lors d'une diminution de l'assimilation chlorophyllienne. Elles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal

Ellesprotègentlesplantescontrelesmicroorganismesetlesdéprédateurs.[Moreno-Mari etal.\(1999\)](#),préconisentlaculturedesplantesaromatiquesdanslesserrescarellesprésentent dans leurs feuilles et leurs tiges de nombreuses huiles et substances secondaires qui peuvent agir comme des substances répulsives pour les insectes (communication chimique : phéromones et autres messages pour les symbiontes).

Elles favorisent la pollinisation en attirant les insectes pollinisateurs (Bruneton, 1999), et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement.

II.8. Les facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des HEs est influencée par une multitude de facteurs, qui peuvent induire une variabilité significative dans leurs profils phytochimiques. Parmi ces facteurs, le génotype de la plante est fondamental, car il détermine le potentiel biosynthétique de l'espèce ou de la variété concernée (Bakkali et al., 2008). Les variations génétiques au sein d'une même espèce peuvent entraîner des différences marquées dans la composition des HE, comme l'ont démontré des études sur deux sous espèces de *Teucrium scorodonia* de Corse et d'Algérie (Djabou et al., 2012).

Les conditions environnementales, telles que le climat, la saison, l'heure de la journée, le type de sol et la disponibilité en eau et en nutriments, jouent également un rôle crucial dans la modulation de la composition des HEs. Par exemple, la concentration en composés volatils peut varier en fonction de l'intensité lumineuse, de la température ou du stress hydrique subi par la plante (Llusià et al., 2006). Il a été montré que le basilic cultivé au Madagascar en pleine lumière conduit à un taux de chavicol de 57% alors que la même plante cultivée à l'abri en contient jusqu'à 74%. Ces différences qui peuvent être extrêmement importantes influent sur les propriétés biologiques de l'huile essentielle (Lahlou, 2004^a). Des études ont montré que des conditions de sécheresse peuvent augmenter la concentration de certains monoterpènes dans les HE, tandis que des températures élevées peuvent favoriser la volatilisation et la modification de certains composants (Sirousmehr et al., 2014 ; Burkle & Runyon, 2016; Zi et al., 2022). De plus, la saisonnalité affecte la phénologie des plantes et, par conséquent, la composition des HEs, avec des variations observées dans les profils chimiques au cours des différentes phases de croissance et de développement végétal (Figueiredo et al., 2008).

Les pratiques agronomiques et les méthodes de récolte et de distillation sont d'autres facteurs déterminants pour la composition des HEs. La distillation, sa durée, et même le matériel utilisé peuvent influencer la qualité et la quantité des composés extraits (Bousbia et al., 2009). Des variations très importantes peuvent être observées chez le coriandre par exemple, où la teneur en linalol est de 50%, plus élevée chez le fruit mûr que chez le fruit vert (Lahlou et al., 2004^b).

En outre, les traitements post-récolte, tels que le séchage et le stockage, peuvent également altérer la composition des HEs. Le séchage peut entraîner une évaporation des composants les

plus volatils et une oxydation de certains constituants, tandis que des conditions de stockage inappropriées, comme une exposition à la lumière ou à des températures élevées, peuvent accélérer la dégradation des composés (Qin and al., 2022). Il est donc essentiel de contrôler ces paramètres pour préserver l'intégrité des HEs.

Enfin, les interactions biotiques, telles que les attaques de pathogènes ou la présence de symbiotes, peuvent induire des changements dans la production et la composition des HE en tant que réponse de défense de la plante. Les plantes peuvent moduler la synthèse de certains composés antimicrobiens ou antifongiques en réponse à une infection, ce qui se reflète dans la composition chimique de l'HE produite (Pichersky and Gershenzon, 2002; Bakkali et al., 2008).

II.9. Les techniques d'extraction des huiles essentielles

Le choix des méthodes d'extraction des HEs revêt une importance cruciale en raison de la diversité et de la complexité chimique de ces dernières. Il est essentiel d'opter pour une technique d'extraction non sélective en terme de polarité et qui prévient les altérations biochimiques telles que la dégradation thermique, l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse, les variations de pH, ou la perte de composés volatils. Ainsi, une attention particulière doit être portée aux paramètres d'extraction et aux propriétés physico-chimiques des HEs pour garantir l'intégrité et la représentativité de l'extrait final. Des méthodes telles que la distillation à la vapeur, l'extraction par solvant, ou les techniques d'extraction assistée par ultrasons sont couramment évaluées pour leur efficacité et leur sélectivité, en tenant compte des caractéristiques spécifiques des HEs ciblées (Lucchesi et al., 2004; Périno-Issartier et al., 2011). La distillation à la vapeur, par exemple, est largement utilisée pour sa capacité à préserver les composés thermosensibles, mais elle peut être moins efficace pour extraire des composés à haut poids moléculaire ou très polaires (Reverchon, 1997). L'extraction par solvant peut offrir une meilleure récupération de ces composés, mais elle risque d'introduire des résidus de solvant dans l'HE (Azmir et al., 2013). Les techniques modernes, comme l'extraction supercritique au CO₂, offrent une alternative en permettant un contrôle précis sur les paramètres d'extraction et en minimisant les risques de dégradation, bien que leur coût et leur complexité technique puissent être des contraintes (Lang & Wai, 2001).

Il est donc impératif de choisir une méthode d'extraction adaptée aux caractéristiques spécifiques de l'HE visée, en considérant les avantages et les inconvénients de chaque technique. La compréhension approfondie des propriétés physico-chimiques des composés

présents dans les HE est fondamentale pour optimiser le processus d'extraction. Les paramètres tels que la pression, la température, le temps d'extraction, et le choix du solvant doivent être méticuleusement ajustés pour maximiser le rendement tout en préservant la qualité et la pureté de l'HE (Burt, 2004). Selon Grass (2012), la macération, la décoction et l'enflourage marquent les débuts du processus d'extraction.

II.9.1. La distillation

La plupart des composants odorants contenus dans les végétaux sont entraînés à la vapeur d'eau. Le flux de vapeur d'eau et des composés organiques volatils sont entraînés par distillation azéotropique, et, après condensation par refroidissement dans un réfrigérant, se séparent par différence de densité. L'HE, la plupart du temps plus légère que l'eau, surnage et peut être récupérée dans des séparateurs, dont le fameux « vase florentin ». On distingue deux types de distillation des plantes (Monin, 2012) :

Hydrodistillation: le végétal est immergé dans l'eau portée à ébullition (Figure 7) ;

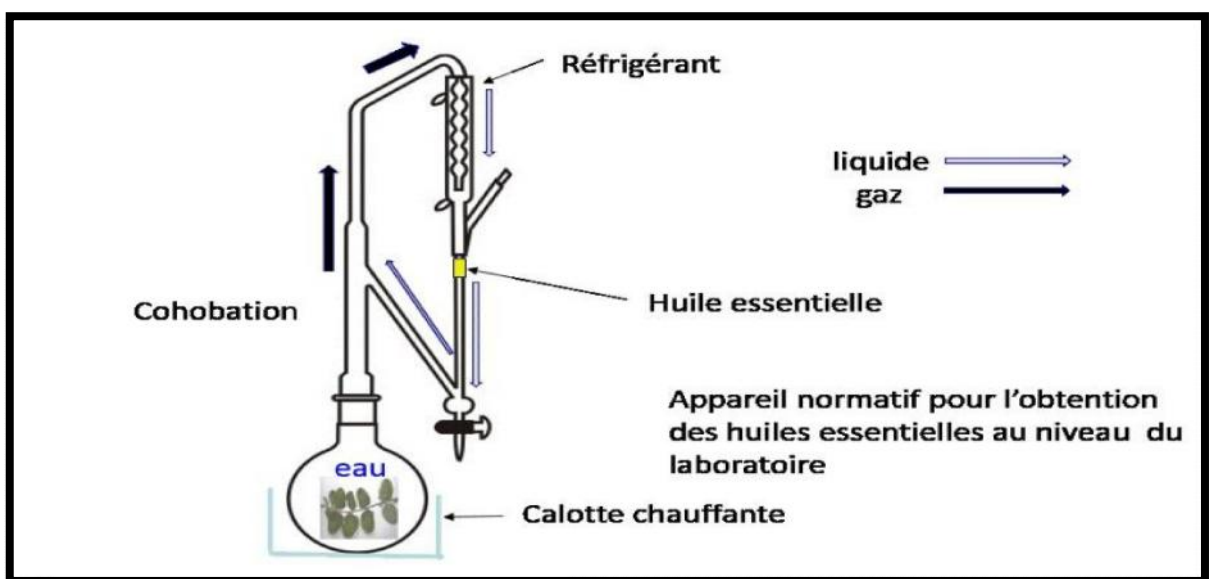


Figure 7: Schéma d'un appareil de type Clevenger (Adapté de Garcia, 2017)

Entraînement vapeur, où seule la vapeur d'eau traverse la masse végétale, avec deux variantes selon que la vapeur est humide ou sèche (Figure 8).

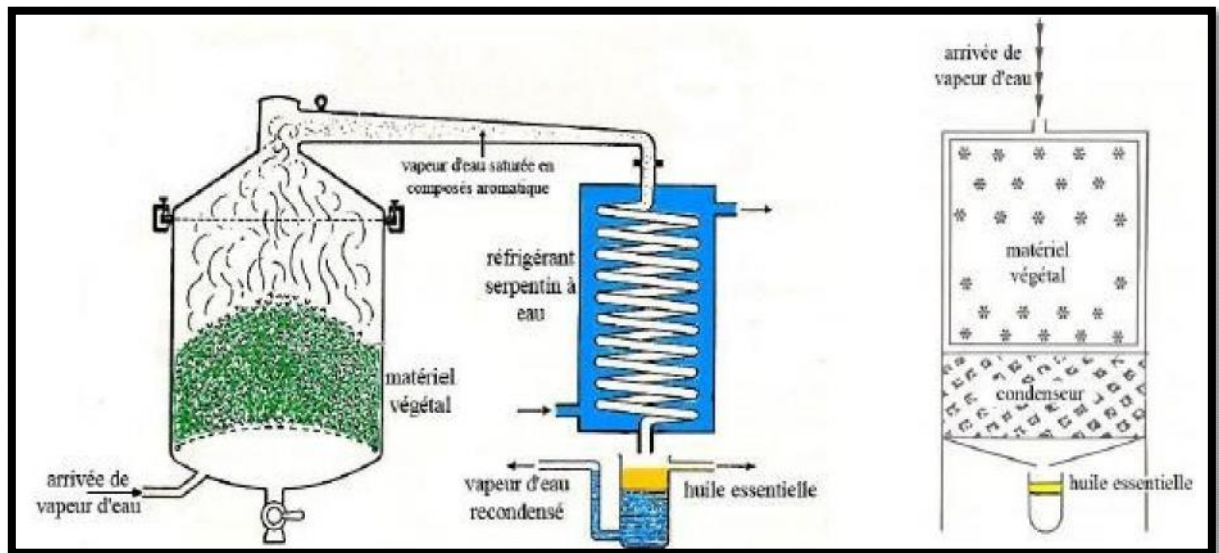


Figure8:Principed'entrainementàlavapeurd'eauetd'hydrodiffusion(Adaptéde [Lucchesi,2005](#)).

II.9.2. Expressionàfroid

Les essences de citrus (orange, citron, limette, bergamotte, pamplemousse, cédrat...) ne sont pas obtenues comme précédemment par hydrodistillation ou entraînement à la vapeur d'eau des alambics, mais par expression à froid du péricarpe des fruits, qui fait éclater les cellules et libère l'HE qui se trouve dans la peau ou zeste ([Monin, 2012](#)).

Lesappareilsutilisésontdesmachinesencontinuigrattent(pellatricesitaliennes, **Figure9**)etpressent(sfumatricesitaliennes,**Figure10**).

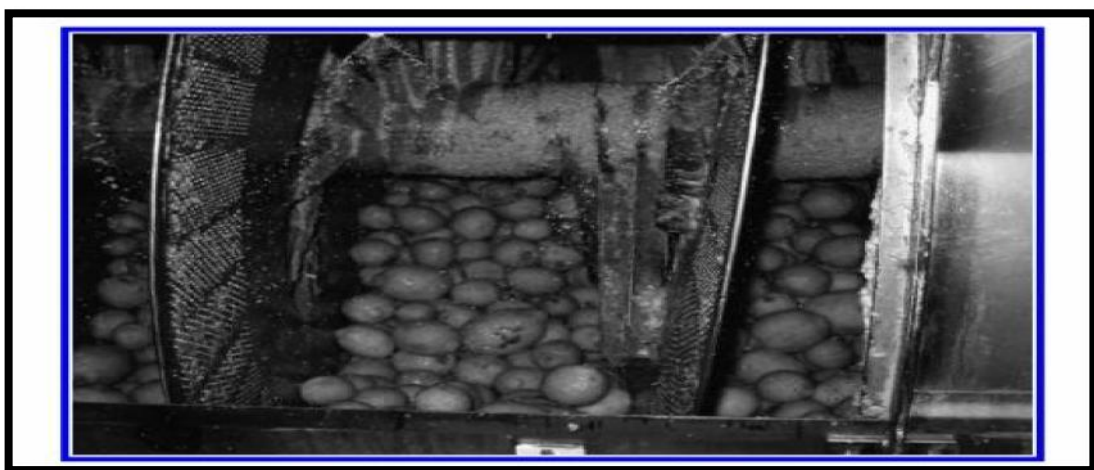


Figure9:MethodePellatric(appareillage detypepellatriceavechéliced'Archimèdedopée aux citrons, lavée à l'eau). (Adapté de [Schmidt, 2020](#))

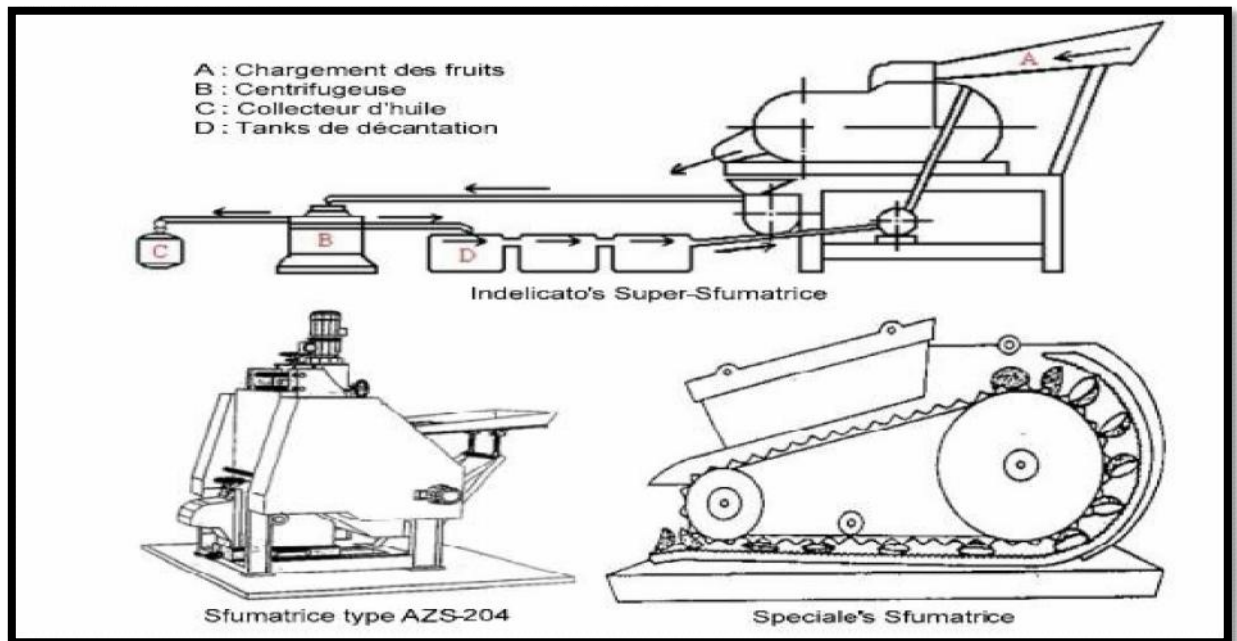


Figure10:Schémadequelquessfumatrices(AdaptédeBousbia,2011).

II.9.3. L'extractionparsolvantsvolatilsdesextraitsaromatiques

La technique d'extraction "classique" par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé "concrète". Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une "absolue". Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention des solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer. Le choix du solvant d'extraction va s'avérer très délicat, d'autant que la législation sur les produits à destination de l'industrie agro-alimentaire est extrêmement rigoureuse. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extract. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense : le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations.

L'hydrodistillation-extractionsimultanéeeetl'extractionparSoxhletensontlesprincipales (**Figure 11**) ([Bousbia, 2011](#)).

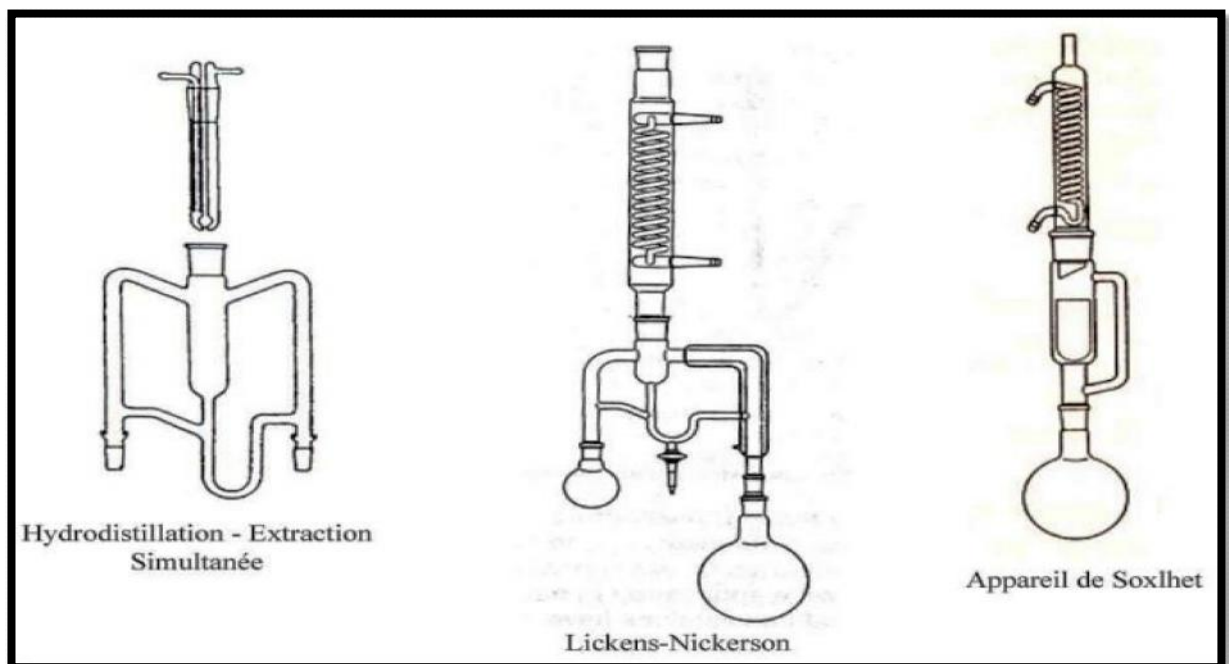


Figure11:Dispositifsd'extractionparsolvantsvolatiles(Adaptéde [Bousbia,2011](#))

II.9.4. L'extractionparCO₂subcritique(CS-CO₂)

Développé dans les années 80, cette technologie devient aujourd'hui la plus prometteuse des techniques d'extraction. Elle donne en général des extraits de qualité différente de ceux obtenus par les autres techniques. C'est un cas particulier de l'extraction par solvant avec la différence qu'ici le solvant est un gaz liquéfié, évaporé ensuite par simple décompression. Le plus utilisé étant le CO₂ à l'état supercritique ($T_c = 31^\circ\text{C}$, $P_c = 73,8$ bars). Celui-ci présente l'avantage d'être un fluide ininflammable, non explosif, non toxique, non corrosif, inodore et inerte. Le fait d'opérer à une température faible critique du CO₂ ($31,1^\circ\text{C}$) permet d'extraire et sauvegarder les composants fragiles des HEs (lilas, muguet, etc.). Ce procédé est largement utilisé en industrie pharmaceutique permettant l'extraction des composés actifs ([Santoyo et al., 2014](#)).

L'utilisation de l'extraction par CO₂ supercritique permet d'éviter la dégradation thermique et la décomposition des composés labiles du fait que l'opération est effectuée à une basse température, tandis que l'absence de la lumière et de l'oxygène empêche les réactions d'oxydation ([Diaaz-Reinoso et al., 2006](#)). L'efficacité de la technique d'extraction SC-CO₂ est associée à plusieurs paramètres, notamment la température, la pression, le flux de CO₂ supercritique, la présence de co-solvant et le temps d'extraction ([Diaaz-Reinoso et al., 2006](#)).

L'extraction par SC-CO₂ est adaptée pour extraire des huiles et des composés lipophiles, mais de nombreux composés phénoliques naturels sont peu solubles dans ce solvant ([Pereira & Meireles, 2010](#)). La présence de co-solvant permet alors d'améliorer le rendement d'extraction par augmentation de la solubilité. Le type de co-solvant utilisé est déterminé en tenant compte de l'affinité entre le co-solvant et les composés cibles ([Pereira & Meireles, 2010](#)). Les co-solvants les plus fréquemment utilisés sont le méthanol et l'éthanol qui induisent des interactions dipôle/dipôle et à former une liaison hydrogène avec des groupes fonctionnels polaires. Le matériel végétal est mis dans un récipient cylindrique à extrémités poreuses. Celui-ci est ensuite placé à l'intérieur d'un extracteur thermostatiquement contrôlé. Le fluide supercritique est distribué par l'extracteur, dissolvant les composés organiques du matériel à l'intérieur du récipient. Plus tard la pression est en partie libérée dans le séparateur B, qui convertit le fluide supercritique en phase gazeuse. Les composés organiques dissous sont séparés du gaz qui est alors liquéfié dans le condensateur C, en diminuant la température (**Figure 12**) ([De Castro et al., 1999](#) ; [Starmans & Nijhuis, 1996](#); [Nakatsu et al., 2000](#)).

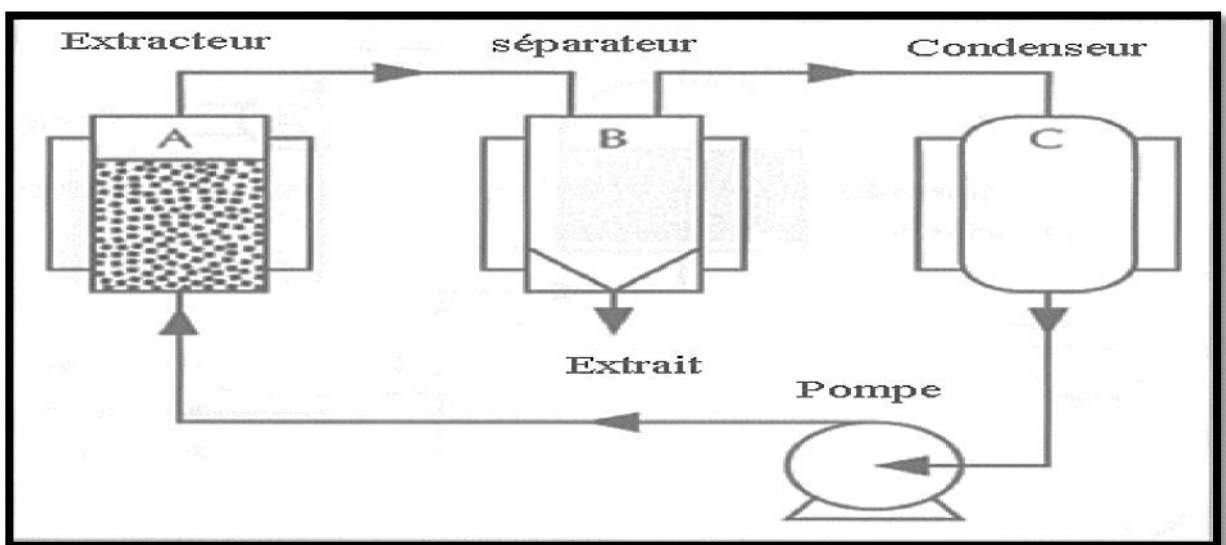


Figure 12: Une représentation simplifiée d'une installation d'extraction au CO₂ supercritique

(Adapté de : [Starmans & Nijhuis, 1996](#))

Outre les méthodes traditionnelles, les avancées technologiques récentes ont conduit à l'élaboration de techniques d'extraction d'huiles essentielles novatrices. Ces procédés innovants se distinguent par leur capacité à optimiser l'efficacité et à augmenter les rendements tout en minimisant leur impact environnemental. Des méthodes telles que l'extraction par fluide supercritique, la distillation par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction par solvants sous pression ambiante et l'hydrodistillation sous vide sont à la pointe de ces avancées,

offrant des alternatives plus vertes et plus durables pour l'obtention d'huiles essentielles de haute qualité. Ces techniques révolutionnent l'industrie en réduisant la consommation d'énergie et en éliminant l'utilisation de solvants chimiques.

III. Phénomènes physico-chimiques et facteurs altérant les huiles essentielles

Au cours de l'hydrodistillation, le milieu aqueux possédant un pH compris entre 4 et 7 (résultant de l'immersion du matériel végétal), atteint occasionnellement des valeurs inférieures à 4 pour certains fruits. Les constituants de l'essence natives sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur, et peuvent subir des conversions chimiques (Morin & Richard, 1985). L'huile essentielle récupérée est un produit qui diffère sensiblement de l'essence originelle, d'autant plus que l'ébullition est longue et le pH est faible.

La matière chimique présente dans le végétal fait l'objet de réactions chimiques diverses (Figure 13): hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisations pouvant être catalysées par des métaux présents à l'état de traces dans la plante, provoquant des transformations chimiques des constituants (Koedam, 1982). L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit durant le chauffage du végétal. Elle conduit à la formation d'acides organiques qui à leur tour catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation. La dégradation du sabinène donne un exemple de transformations chimiques de l'huile essentielle lors de l'hydrodistillation. Les fréquentes modifications chimiques du sabinène ont été étudiées par Koedam *et al.* (1980). Ils constatèrent qu'en milieu acide dilué, ce composé se transforme en terpinène-4-ol. Divers auteurs ont confirmé ce résultat et ont montré que le réarrangement du sabinène produit en plus du terpinène-4-ol, de l' α -terpinène, du γ -terpinène, et du terpinolène. Pour limiter les artefacts, il est préconisé de maintenir le pH proche de la neutralité et de minimiser la durée d'hydrodistillation, quand bien même, il est bien connu que la dégradation de la matière végétale induit la formation d'un milieu acide fortement tamponné (Koedam *et al.*, 1980).

En résumé, parmi les constituants sujets aux artefacts, on note particulièrement : les monoterpènes (mono et bicycliques), les alcools monoterpéniques, les amino-acides soufrés et les oxydes monoterpéniques. Les étapes successives conduisant à l'isolement d'une essence et les diverses transformations susceptibles de l'accompagner se traduisent par la modification de la teneur en certains constituants ou par la formation de nouveaux composés, d'où une grande variabilité de sa composition. De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent

intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle. La période de récolte, les conditions de transport, de séchage et de stockage peuvent engendrer des dégradations enzymatiques. Les changements les plus importants interviennent lors de l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (pH, température) et de la durée d'extraction.

D'autres facteurs tels que les traitements survenus avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle. Les variations de la composition des huiles essentielles provenant d'un même phénotype se développent dans le même environnement sont l'expression de différences génotypiques. Elles peuvent être attribuées à des hybridations, à un polymorphisme génétique ou à des mutations.

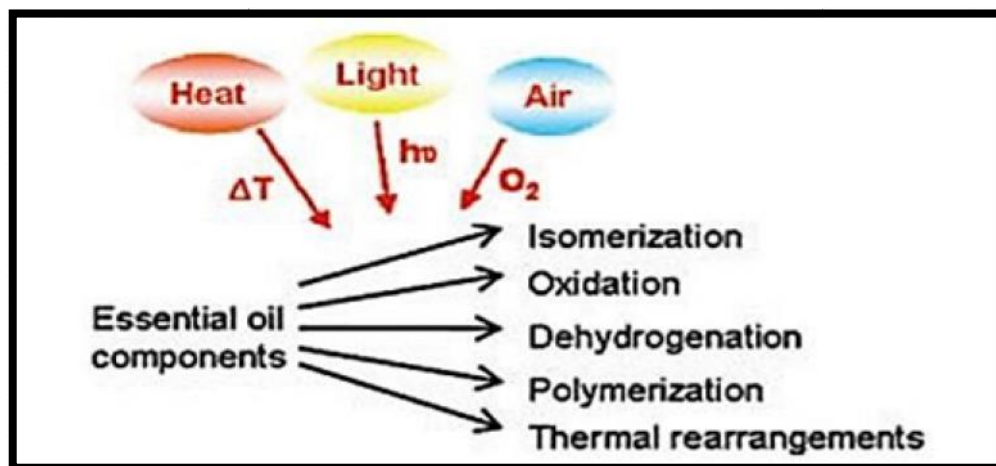


Figure 13: Réactions de conversion possibles dans les huiles essentielles (Adapté de Turek & Stintzing, 2013)

IV. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

Parmi les méthodes d'analyse des huiles essentielles, les méthodes chromatographiques sont les plus utilisées. La chromatographie est une technique d'analyse qui consiste à séparer les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (gaz vecteur) le long d'une phase stationnaire qui peut être solide ou liquide fixée.

L'analyse des huiles essentielles a deux objectifs principaux à savoir l'identification et la quantification des différents constituants, et l'évaluation de la qualité des huiles et détection de toute altération pouvant affecter leur utilisation. Cette analyse se compose généralement de plusieurs

séquences. La première consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Cette technique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage « en ligne » de la CPG avec la spectrométrie de masse (SM). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des constituants individualisés avec les caractéristiques des produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles (Paolini, 2009).

IV.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique dont l'application remonte au début des années 40. Elle a concerné le contrôle des fractions légères des raffineries de pétrole. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence conférée par les nombreuses phases stationnaires et les nombreuses analyses mises au point (Arpino et al., 1995).

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est, comme toutes les techniques de chromatographie, une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino et al., 1995). La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit.

IV.1.1. Fonctionnement

Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

Les appareils de chromatographie gazeuse sont appelés chromatographes. Ils sont principalement composés :

- D'un four qui permet une programmation de température ajustable de 20 à 450°C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide ;

- D'un système d'injection, qui va permettre d'introduire et de rendre volatil l'échantillon à analyser. L'injection peut se faire d'une manière manuelle ou automatique à l'aide d'un échantillonneur ;
- D'une colonne capillaire ou remplie, sur laquelle les différentes molécules de l'échantillon injecté vont se séparer suivant leurs affinités avec la phase stationnaire ;
- D'un système de détection, qui va permettre de mesurer le signal émis par les différentes molécules et de pouvoir les identifier. Pour l'enregistrement du signal émis par le détecteur, des logiciels sur PC remplacent avantageusement les enregistreurs analogiques sur papier.

L'échantillon, généralement un liquide volatil, est d'abord introduit en tête de colonne par l'intermédiaire d'une micro seringue qui va traverser une pastille en caoutchouc, appelée septum, pour se retrouver dans une petite chambre en amont de la colonne appelée injecteur. L'injecteur est traversé par le gaz porteur et porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Les quantités injectées peuvent varier de 0.2 à 5.0 μ l.

Ensuite, une fois rendus volatils, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le gaz porteur (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La phase stationnaire peut être un liquide non ou peu volatil (chromatographie gaz-liquide) ou un solide adsorbant (chromatographie gaz-solide). Dans les deux cas, la phase stationnaire va provoquer un phénomène de rétention chromatographique avec les différents composés (appelés solutés).

Plus le composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne. La grandeur expérimentale brute est appelée temps de rétention. C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur. Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne (élution), il faut déterminer la bonne température du four. En général, la température doit être supérieure à la température d'ébullition des composés. On peut travailler en isotherme, c'est-à-dire avec une température fixe durant toute l'analyse ou avec un programme de température qui varie. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est appelé détecteur. Cet élément évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés à cause du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux.

Le détecteur envoie un signal électronique vers un enregistreur (sorte d'imprimante) qui dessine les courbes de chaque pic en fonction de leur intensité (courbe de type Gaussienne).

L'ensemble des pics est appelé chromatogramme. Actuellement et de plus en plus, les logiciels remplacent avantageusement les enregistreurs papiers pour l'interprétation des signaux envoyés par les détecteurs, dans le cas, où la CPG est associée à la spectroscopie de masse, on parle de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse, dans ce cas l'identification des composés se fait par détection des ions positifs après ionisation par impact électronique de composé.

IV.1.2. Identification

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalée d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indice de rétention). Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : engendrant la spectrométrie de masse (CPG/SM). La combinaison de ces deux techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides ([Cavali, 2002](#); [Paolini, 2009](#) ; [Garcia 2017](#)).

IV.2. Le couplage CPG/SM

Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. Dans la source d'ionisation les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le « piège à ion » ou « ion trap ». Le quadripôle ainsi que l'« ion trap » utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge (m/z). Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques (ayant idéalement une section

hyperbolique). Union positif pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne se soit déchargé sur cette barre, il changera de direction.

Dans les appareils à quadripôle, on règle les potentiels de manière telle que les ions d'une masse déterminée ne traversent les barres. Les ions sont donc soumis à l'influence d'un champ électrique total constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant résultant de l'application sur les barres de tensions électriques positives et négatives. Les ions accélérés suivant l'axe z pénètrent entre les barres du quadripôle et conservent leur vitesse, mais ils sont soumis suivant x et y aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques. Tant que simultanément x et y restent inférieurs à la moitié de la distance séparant deux barres, l'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres. Sinon, il s'y déchargera et ne sera pas détecté. En ce qui concerne l'« ion trap » (ou quistor), il est constitué d'une électrode circulaire, couverte de deux calottes sphériques. Conceptuellement, on peut voir cet appareillage comme un quadripôle circulaire. La superposition des tensions continues et alternatives permet d'obtenir une sorte de « quadripôle à trois dimensions » dans lequel les ions sont gardés captifs (« piégés ») sur une trajectoire formant une sorte de huit à trois dimensions. Les ions de différentes masses sont présents simultanément dans la trappe, et on cherchera à les expulser en fonction de leur masse pour obtenir le spectre. Cette technique consiste donc à produire des ions directement dans la trappe par impact électronique. Il n'y a pas de source séparée. Les ions sont formés par un flux d'électrons de courte durée et piégés au moyen de radiofréquences. La pression du gaz inerte dans l'analyseur (10⁻³ torr) est plus élevée que celle d'un quadripôle (10⁻⁵ torr). En effet, l'addition d'hélium à cette pression permet d'accroître la sensibilité de la méthode : les collisions entre les molécules d'hélium et les ions augmentent l'efficacité du piège à ion. Cependant, les spectres de masse ainsi obtenus sont modifiés à cause des dissociations induites par collisions et par l'autoionisation chimique, toutes deux résultant de la pression relativement importante dans l'appareil (« vide » moins important). En 1996, la plupart des appareils commercialisés utilisent une source externe. Ils permettent l'obtention de spectres de qualité comparable à ceux des quadripôles ([Cavali, 2002](#); [Paolini, 2009](#) ; [Garcia, 2017](#)) .

Depuis 1995, les performances de ces appareils ont été fortement accrues, de manière à permettre une gamme de masse plus large et des expériences de type SM/SM. Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, est ensuite détecté et transformé en un signal utilisable. Pour ce faire, il existe différents types de détecteurs capables de transformer un courant ionique faible en un signal mesurable. Toutefois, les détecteurs les plus courants sont les multiplicateurs

d'électrons ou de photons, permettant l'augmentation de l'intensité du signal détecté. Ces photons sont ensuite détectés par le photomultiplicateur. Finalement, l'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs des masses et des intensités des pics et en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation : spectres de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc... ([Cavalli, 2002](#) ; [Paolini, 2009](#) ; [Garcia, 2017](#)).

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles.

La valorisation de ces produits naturels, quel que soit leur secteur d'application (parfumerie, cosmétique, aromathérapie), passe obligatoirement par une étape de caractérisation chimique afin de déterminer précisément leurs compositions. Une analyse dite de routine (ex : contrôle qualité dans l'industrie de la parfumerie) est classiquement réalisée à l'aide de la GC(RI) et GC-MS(voie A). Les études plus approfondies, cas d'huiles essentielles plus complexes (molécules qui co-éluent, molécules inconnues) nécessitent l'utilisation de plusieurs étapes de chromatographie associées à plusieurs techniques spectroscopiques (voie B). Ces deux possibilités d'analyse (voies A et B) sont les plus utilisées à l'heure actuelle pour la caractérisation chimique des produits naturels (**Figure 14**).

Cependant, une troisième voie (voie C) se situe à mi-chemin entre les voies A et B. En effet, elle est presque aussi «rapide» que la voie A et présente une capacité d'identification qui se rapproche de celle de la voie B. Elle met en œuvre la RMN du ^{13}C pour identifier les constituants du mélange sans séparation préalable suivant une méthodologie d'analyse développée depuis une vingtaine d'années par l'équipe «Chimie et Biomasse» ([Cavalli, 2002](#); [Garcia, 2017](#))

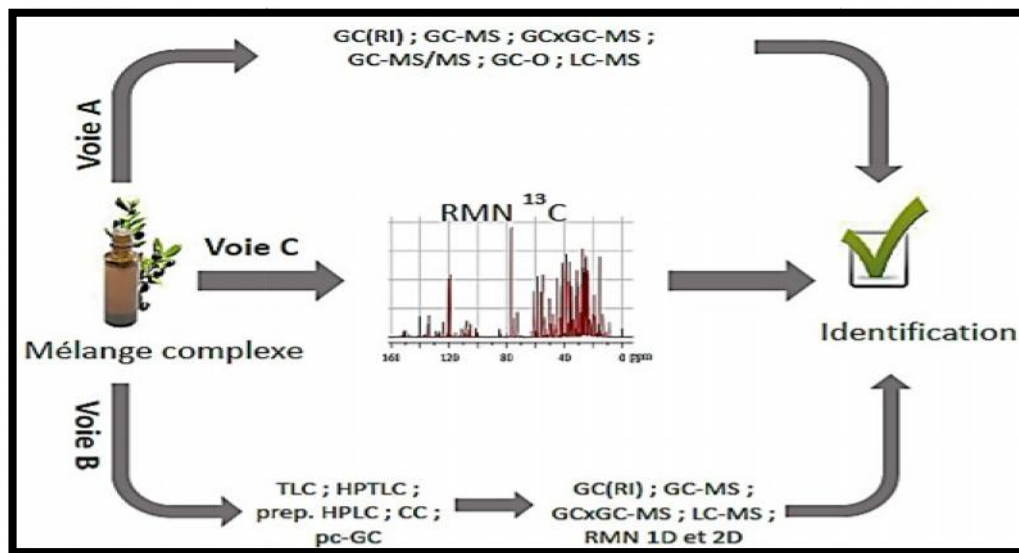


Figure14:Méthodesd'analysed'unmélangecomplexe(AdaptédeGarcia,2017).

V. Lesactivitésbiologiquesdeshuilesessentielles

Le rôle physiologique des huiles essentielles pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant,ladiversitémoléculairedesmétabolitesqu'ellescontiennent,leurconfèredesrôles et des propriétés biologiques très variés.

V.1. Activitéantibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles connue de façon empirique depuis des siècles a été scientifiquement démontrée par plusieurs études. Celles-ci ont prouvé que les huilesessentiellesontunspectred'actiontrèslargepuisqu'ellesinhibentaussibienlacroissance des bactéries à Gram négatif que celle des Gram positif (Cosentino et al., 1999; Lambert et al., 2001; Ebrahimi et al., 2008; De Martino et al., 2009). L'étude de l'activité des huiles essentielles sur les spores de *Bacillus subtilis* réalisée par Lawrence et Palombo en 2009 a démontré que les huiles essentielles ont également une activité sporicide.

Le pouvoir antiseptique des huiles essentielles s'exerce à l'encontre de diverses bactéries pathogènes, y compris les souches habituellement antibiorésistantes. Une grande variété d'huiles essentielles est connue pour posséder des propriétés antimicrobiennes dues à la présence de constituants actifs. L'activité inhérente de ces huiles peut être prévue pour se relier à la configuration chimique de ses composants, aux proportions dans lesquelles ils sont présents et aux interactions possibles entre eux (Dorman & Deans, 2000).

Certains chercheurs ont montré que la puissance de l'action des huiles essentielles varie selon leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque huile, qui est largement diversifié (Skandamis & Nychas, 2001 ; Carson *et al.*, 2002 ; Burt, 2004 ; Moreira *et al.*, 2005).

Il est admis que l'activité antibactérienne des huiles essentielles se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leur composé majoritaire : Phénol (thymol, carvacrol et eugenol) > alcool (α-terpène, terpinen-4-ol, linalol) > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters (Dorman & Deans, 2000 ; Burt, 2004 ; Holley & Patel, 2005). L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable. Quelques études ont conclu que les huiles essentielles entières ont une plus grande activité antibactérienne que leurs composants principaux mélangés, ce qui suggère que les composants mineurs soient critiques à l'activité et puissent avoir un effet synergique ou une influence de renforcement (Faleiro *et al.*, 2003). Cependant certaines études ne corroborent pas les effets de synergies mentionnés. Une combinaison de concentrations comparables en thymol et en carvacrol produit bien l'inhibition de l'huile essentielle, mais les autres composés minoritaires ont pour effet de diminuer l'effet des principaux composés actifs phénoliques (Lambert *et al.*, 2001 ; Skandamis *et al.*, 2001).

Mécanisme

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et leurs composants soient démontrés, leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé (Lambert *et al.*, 2001 ; Lahlou, 2004^a). Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action et qu'il existe plusieurs cibles potentielles (Figure 15) (Skandamis *et al.*, 2001 ; Carson *et al.*, 2002 ; Burt, 2004 ; Soković *et al.*, 2007).

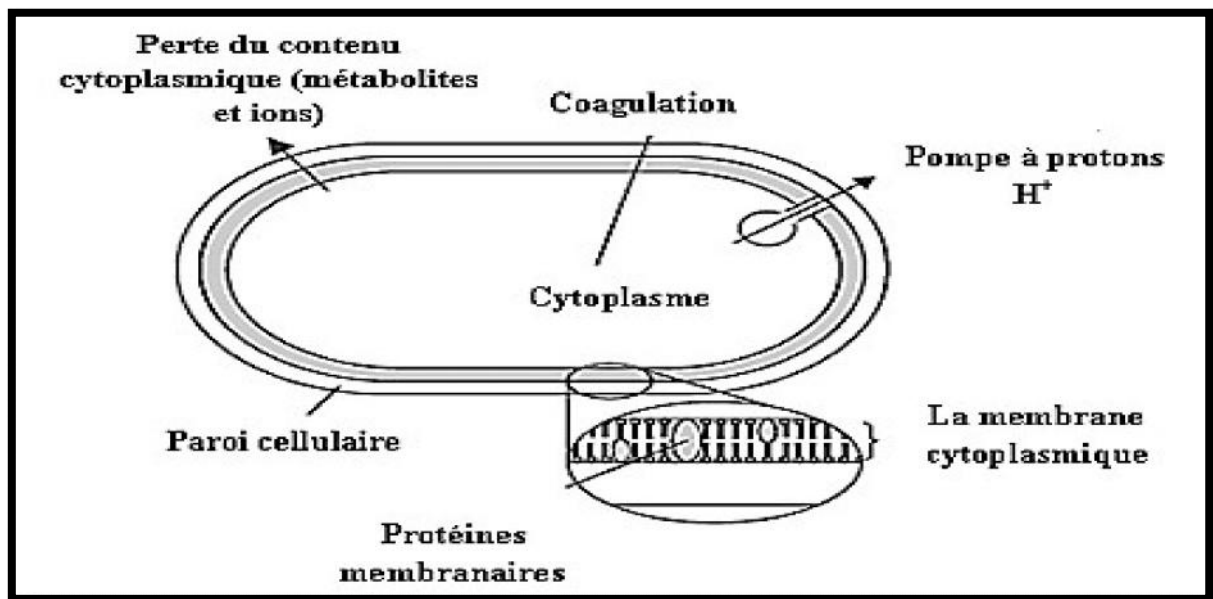


Figure15: Les cibles présumées des huiles essentielles (Adapté de: [Burt, 2004](#))

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques de ses composants actifs. En raison de leur caractère lipophile, les monoterpènes cycliques s'incrustent entre les chaînes d'acide gras de la bicouche lipidique, ce qui les rend capables de se partager dans les lipides membranaires de la cellule bactérienne et des mitochondries. Ceci a comme conséquence l'expansion de la membrane, sa plus grande fluidité ([Sikkema et al., 1994](#) ; [Cox et al., 2000](#)), la fuite du contenu cellulaire, réduction du potentiel membranaire et du H^+ intracellulaire ([Skandamis et al., 2000](#); [Ultee et al., 2002](#)) et l'affaiblissement de plusieurs systèmes enzymatiques, y compris ceux impliqués dans la production énergétique et la synthèse des composants structuraux ([Cox et al., 2001](#) ; [Singh et al., 2002](#); [Moreira et al., 2005](#)). Cet effet semble dépendre de la composition en lipides et de la charge extérieure des membranes cytoplasmiques ([Trombetta et al., 2005](#)).

Le mécanisme d'action de ces huiles serait similaire à d'autres composés phénoliques; ceci est généralement considéré comme un trouble de la membrane cytoplasmique, interrompant la force motrice des protons (PMF), le flux d'électrons, le transport et la coagulation active du contenu cellulaire. Des enzymes telles que les ATPase sont connues pour être situées dans la membrane cytoplasmique et être encadrées par des molécules lipidiques. Deux mécanismes possibles ont été suggérés. Les molécules lipophiles peuvent s'accumuler dans la bicouche lipidique et perturber l'interaction protéines-lipides ; alternativement, l'interaction directe des composés lipophiles avec les parties hydrophobes de la protéine est possible ([Burt, 2004](#)).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend également du type de micro-organisme qui, en général, n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des huiles essentielles :

- La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé. Une huile essentielle peut être bactéricide vis-à-vis de certaines souches, bactériostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet ([Lahlou, 2004^b](#)).
- Les bactéries à Gram négatif s'avèrent généralement plus résistantes que les Gram positifs aux effets antagonistes des huiles essentielles. Les bactéries à Gram négatif (ex : *Pseudomonas aeruginosa*) montrent une résistance intrinsèque à une grande variété d'huiles essentielles, qui est associée à la surface hydrophile de leur membrane externe. Riche en molécules de lipopolysaccharide, elle empêche la diffusion des composants hydrophobes de ces huiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, dépourvues de membrane externe, elles sont plus vulnérables ([Smith-Palmer et al., 1998](#); [Burt, 2004](#) ; [Soković et al., 2007](#)). Certains composés phénoliques (carvacrol et thymol) adhèrent à ces bactéries par fixation aux protéines et au lipopolysaccharide membranaire grâce à leurs groupements fonctionnels. Ils causent la rupture de la couche externe suivie de sa désintégration partielle atteignant ainsi la membrane interne plus susceptible ([Dorman & Deans, 2000](#)).

V.2. Activité antifongique

Les composés volatils des huiles essentielles sont identifiés comme des molécules lipophiles de poids moléculaire faible qui ont une propension à se volatiliser à des températures plutôt basses ([Utama et al., 2002](#); [Pichersky et al., 2006](#)). En comparaison avec leurs pendant végétaux, les huiles essentielles renferment une concentration élevée de ces substances volatiles ([Edris & Farrag, 2003](#)). Les huiles essentielles volatiles comportent un mélange complexe de composés, principalement constitués de monoterpènes et de sesquiterpènes ([Dorman & Deans, 2000](#)). Les composés prédominants sont les alcools, les aldéhydes, les esters, les cétones, les phénols, les oxydes, les coumarines et les phénylpropènes ([Dorman & Deans, 2000](#)).

Il a été prouvé qu'un large éventail de composés volatils d'huiles essentielles possède une activité contre divers champignons filamenteux et levures, y compris des pathogènes animaux et végétaux ([Inouye et al., 2001^{a,b}](#); [Inouye et al., 2006^{a,b}](#), [Sharma & Tripathi, 2006](#); [Helal et al., 2006](#); [Tullio et al., 2007](#)). Une possible corrélation entre les composants principaux des huiles essentielles et l'activité antifongique de l'huile ou de ses volatils a conduit à la proposition que ces huiles devraient être classées en fonction de leurs principaux composés actifs plutôt que par espèce végétale ([Inouye et al., 2006^a](#)).

Inouye et al. (2006^a) ont fait état de l'activité des vapeurs de 72 HEs contre *Trichophyton mentagrophytes*, démontrant que les huiles essentielles dont le composant principal est le phénol présentent l'activité de vapeur la plus forte. Ils suggèrent que l'ordre de puissance des vapeurs d'huiles essentielles, du plus fort au moins fort, peut être établi comme suit : huiles riches en phénol > aldéhyde > alcool > cétone > ester (= éther/oxyde) > hydrocarbure. Le **Tableau 1** donne des exemples d'huiles appartenant à chacun de ces groupes, ainsi que la dose fongicide minimale moyenne. Des variations ont été signalées concernant ce lien potentiel entre le constituant le plus abondant et l'activité (**Amvam-Zollo et al., 1998; Kalemba & Kunicka, 2003**). Par exemple, **Kalemba & Kunicka (2003)** ont indiqué que, dans leur étude, les huiles cétoniques sont en réalité plus actives que les huiles alcooliques. Bien que cette délimitation de l'activité ne soit pas définitive, en raison de certaines variations d'activité au sein des groupes, elle permet néanmoins d'établir un classement général de l'activité probable.

Il est difficile de déterminer le rôle exact de la synergie entre les différents composants des HEs. **Lis-Balchin et al. (1998)** ont avancé l'idée que la synergie entre les composants moins présents dans les huiles pourrait ne pas avoir d'importance significative. Toutefois, d'autres études indiquent que la synergie entre les composants est cruciale (**Edris & Farrag, 2003; Lis-Balchin et al., 1998**). Par exemple, il a été prouvé que l'effet fongicide de l'huile de basilic n'est pas le même lorsque ses principaux composants (linalol et eugénol) sont utilisés séparément. Cet effet n'est observé que lorsque ces deux composants sont utilisés ensemble, dans les mêmes proportions que dans l'huile de basilic naturelle (**Edris & Farrag, 2003**). Ce sujet nécessite une investigation plus poussée. Il est probable que d'autres facteurs, tels que la méthode et la vitesse d'évaporation, ainsi que la viscosité, jouent également un rôle important. Ces facteurs influencent la concentration finale des composants individuels dans l'air. En effet, il a été observé que la vitesse d'évaporation influence l'efficacité antifongique et, par conséquent, l'utilisation potentielle d'une huile essentielle volatile (**Edris & Farrag, 2003**).

Mécanisme d'action

Le mécanisme précis par lequel les huiles essentielles volatiles exercent leur action sur les champignons demeure encore indéterminé. Néanmoins, plusieurs effets et hypothèses ont été évoqués dans la littérature scientifique, incluant l'inhibition de la sporulation, la perturbation de la paroi cellulaire et des membranes, ainsi que l'interférence avec la germination et l'élongation hyphale (**Inouye et al., 2001^{a,b}; Alvarez-Castellanos et al., 2001**). Il est plausible que, compte tenu de la diversité des effets induits par les différentes huiles sur des champignons spécifiques,

le mécanisme d'action des HEs volatiles puisse varier de manière significative par rapport à celui des huiles incorporées directement dans le milieu de culture (Pauli, 2005).

D'une manière générale, un consensus s'est dégagé de la littérature scientifique selon lequel les composés volatils des huiles essentielles induisent des modifications morphologiques significatives au niveau des hyphes, notamment une diminution du diamètre et de l'épaisseur de la paroi hyphale. Cette observation est probablement attribuable à l'interférence des constituants des huiles essentielles avec les réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire, conduisant à un assemblage inadéquat des composants de la paroi tels que la chitine, les glucanes et les glycoprotéines (Zambonelli et al., 1996; de Billerbeck et al., 2001; Sharma & Tripathi, 2006 ; Helal et al., 2006). Par ailleurs, des perturbations de la membrane plasmique, une désorganisation de la structure mitochondriale, une réduction du contenu lipidique et des acides gras saturés, une augmentation des acides gras insaturés ainsi que des fuites de Mg^{2+} , Ca^{2+} et K^{+} des cellules/hyphes exposées ont également été rapportées (Sharma & Tripathi, 2006 ; Helal et al., 2006).

Le mécanisme par lequel les composés volatils inhibent la croissance fongique demeure incertain. Certaines études suggèrent que ces composés agissent directement sur le mycélium, tandis que d'autres postulent qu'ils exercent leur action de manière indirecte, en étant absorbés par le milieu de croissance et en se diffusant à travers le mycélium (Inouye et al., 1998, 2000). Certains chercheurs avancent l'idée qu'une combinaison de ces deux mécanismes pourrait expliquer l'activité antifongique des huiles essentielles volatiles. D'autres encore proposent que le mode d'action est directement proportionnel à la quantité de chaque composé absorbé par les constituants de la phase solide (membrane, granules, etc.). Ainsi, à faible dose, l'activité fongicide serait directement liée aux caractéristiques propres à chaque composé, tandis qu'à des concentrations élevées, les composés des HEs exerceraient une action fongicide via un mécanisme commun (Edris & Farrag, 2003; Pauli, 2005). Cette hypothèse suggère donc une dualité dans le mode d'action des huiles essentielles, dépendant à la fois de la concentration des composés et de leurs propriétés intrinsèques. Cette complexité pourrait expliquer la diversité des effets observés et la difficulté à établir un mécanisme d'action universel pour ces composés volatils.

Par exemple, des recherches ont mis en évidence que les huiles volatiles sont absorbées de manière préférentielle par la surface lipophile des mycéliums. De plus, l'efficacité de l'effet inhibiteur de ces huiles semble être proportionnelle à l'étendue de la surface des mycéliums.

(Inouye *et al.*, 1998). Inouye, ainsi que d'autres scientifiques, avancent l'hypothèse que les composés des huiles essentielles volatiles s'associent de façon irréversible aux éléments constitutifs de la membrane cellulaire fongique, provoquant ainsi une fuite des composants intracellulaires (Inouye *et al.*, 2000; Helal *et al.*, 2006). Il est également plausible que l'inhibition de la respiration des mycéliums aériens participe à ce mécanisme (Gocho, 1992).

Des études ont démontré que les composés volatils des huiles inhibent la sporulation des champignons (Alvarez-Castellanos *et al.*, 2001). Il a été postulé que cette inhibition de la sporulation, à l'instar des lésions de la paroi cellulaire, est également liée à des modifications de la membrane cellulaire ou à des dommages à la paroi cellulaire, entraînant une perméabilité accrue et une perte subséquente du contenu cytoplasmique, peut-être lors de la synthèse. À partir de l'analyse de l'activité antispোরulant sur *Microsporium gypseum* d'extraits dont le principal constituant était le patchol, il a été suggéré que cette inhibition pourrait être attribuée à des composants endommageant la paroi cellulaire ou modifiant la perméabilité de la membrane des microconidies, provoquant une perte de cytoplasme, qui à son tour entraînerait la mort de la cellule (Ali *et al.*, 1998).

V.3. Activité herbicide

Le potentiel phytotoxique et herbicide des HE contre les mauvaises herbes a été largement étudié en vue de leur utilisation comme alternative aux herbicides synthétiques. Depuis leur découverte et leur mise au point dans les années 1940, les herbicides synthétiques ont été la principale méthode utilisée pour lutter contre les mauvaises herbes. Leur utilisation excessive a favorisé l'évolution de biotypes de mauvaises herbes résistants aux herbicides, ainsi que des effets nocifs sur la santé humaine et animale et sur l'environnement (Jurado *et al.*, 2011 ; Sabarwal *et al.*, 2018).

L'utilisation des HE dans la lutte contre les mauvaises herbes repose sur le fait qu'elles contiennent des composés allélochimiques, principalement des terpénoïdes, qui peuvent empêcher la germination et la croissance des espèces de mauvaises herbes (Dudai *et al.*, 1999). L'une des premières études à avoir abordé la recherche de composés allélopathiques contenus dans la composition des HE d'un point de vue pratique et en tenant compte de leurs applications possibles en agriculture pour lutter contre les mauvaises herbes, est celle de Dudai et ses collaborateurs en 1999 (Angelini *et al.*, 2003). Ils ont vérifié que les HE avaient un potentiel différent pour empêcher la germination et la croissance des graines d'adventices en fonction de leur composition et de l'espèce contre laquelle elles étaient appliquées. Leurs résultats ont

ouvert de nombreuses possibilités d'utilisation des HEs dans la lutte contre les mauvaises herbes, en utilisant des HEs différentes en fonction des mauvaises herbes à combattre. Un autre travail remarquable est celui de **Tworowski (2002)**, qui a testé les HEs *in vivo* dans des conditions de serre, alors que la majorité des études sur l'activité herbicide des HEs sont réalisées dans des conditions *in vitro*.

La raison d'effectuer des essais *in vitro* avec des HEs est que les essais *in vivo* se heurtent à certaines difficultés, comme la quantité d'huile nécessaire pour les essais, ou la formulation adéquate des HEs à mélanger avec de l'eau et à améliorer leurs propriétés, comme leur persistance et leur pénétrabilité. Dans les travaux de **Tworowski en 2002**, de nombreuses HEs ont été testées et le composé principal (eugénol) de l'HE la plus active (*Syzygium aromaticum*) a été déterminé et il a été vérifié que l'activité herbicide de l'HE de *S. aromaticum* était due à ce composé. **Angelini et al. (2003)** ont testé différentes HEs (*Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* et *Satureja montana*) et leurs principaux composés sur différentes mauvaises herbes et cultures, et ont constaté que l'huile de *S. montana* avec 57% de carvacrol était la plus efficace, inhibant complètement la germination des cultures et des mauvaises herbes. Il convient de noter les travaux de **Vokou et al. (2003)**, qui ont testé le potentiel allélopathique de 47 monoterpénoïdes de différents groupes chimiques contre la germination et la croissance de *Lactuca sativa* L., et ont déterminé que les hydrocarbures, à l'exception du (+)-3-carène, étaient les moins inhibiteurs et que les acétates étaient les moins inhibiteurs des composés oxygénés.

Mécanisme d'action

Les mono- et sesquiterpènes sont connus pour affecter les processus physiologiques des adventices, comme la photosynthèse, la synthèse de la chlorophylle et les perturbations cellulaires, qui peuvent impliquer l'accumulation de globules lipidiques dans le cytoplasme ou la réduction des organites (**Amri et al., 2013**).

Weir et al. (2004) ont souligné que les substances chimiques allélopathiques ont un effet direct sur la germination et la croissance des plantes voisines et interfèrent avec divers processus physiologiques, biochimiques et moléculaires des espèces végétales ciblées (**Figure 16**)

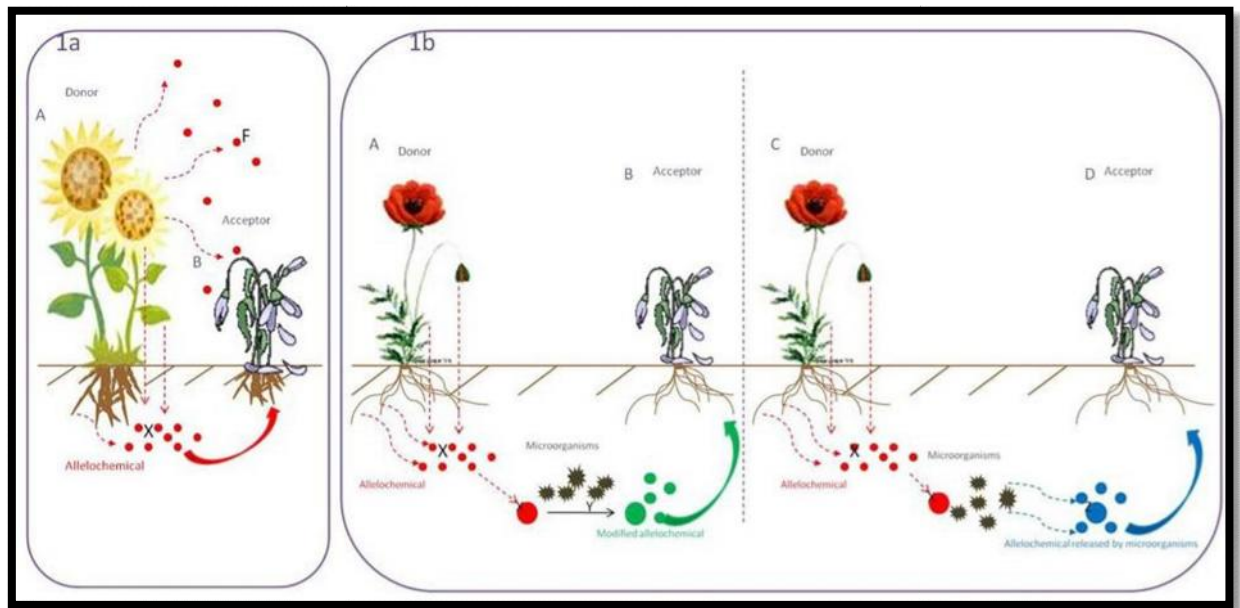


Figure 16: Effet direct ou indirect des molécules allélochimiques

(Adapté de : [Soltys et al., 2013](#))

Selon [Keating, \(1999\)](#), ces substances affectent la division et la croissance cellulaire du fait qu'elles interfèrent avec les protéines ; elles inhibent la photosynthèse en agissant sur la synthèse chlorophyllienne ou inhibent le transport des électrons. De plus, elles ont un effet sur la respiration cellulaire (inhibition de la consommation d'oxygène, oxydation du NADH ou de la production d'ATP). Ces substances interfèrent également avec le métabolisme de l'ARN, de l'ADN, des enzymes et des acides aminés, ce qui souligne leur influence significative sur les fonctions vitales des cellules.

V.4. Activité insecticide

L'utilisation des plantes médicinales et aromatiques représente une voie prometteuse dans la recherche de solutions alternatives pour la lutte contre les ravageurs. Les HEs, en particulier, sont reconnues pour leur efficacité insecticide, comme l'ont souligné [Cosimi et al. \(2009\)](#). Ces substances naturelles, composées d'un complexe de composés actifs, offrent une multitude de mécanismes d'action potentiels contre les insectes nuisibles.

De nombreuses études se sont penchées sur l'efficacité des huiles essentielles dans la lutte biologique, mettant en évidence leur capacité à se dégrader rapidement dans l'environnement, contrairement aux composés synthétiques, et à cibler spécifiquement les insectes nuisibles tout en épargnant les espèces bénéfiques ([Pillmoore et al., 1993](#)). Leur efficacité contre les insectes affectant les produits stockés a été particulièrement bien documentée ([Bazzoni et al., 2002](#)).

Ces dérivés naturels ont également montré leur potentiel en tant que moyen de contrôle des larves de lépidoptères nuisibles, grâce à leurs effets larvicides et antifeedant (Bathal et al., 1993; Park et al., 1997; Larocque et al., 1999), ainsi qu'à leur capacité à retarder le développement et l'émergence des adultes, à provoquer la mortalité des œufs (Marimuth et al., 1997), et à dissuader l'oviposition (Naumann & Isman, 1995). De plus, ils ont démontré des effets répulsifs (Landolt et al., 1999), ce qui les rend particulièrement intéressants pour une gestion intégrée des nuisibles. Cependant, pour que les huiles essentielles puissent être pleinement exploitées comme système alternatif de lutte contre les parasites, il est impératif de surmonter certains défis techniques. Leur volatilité, leur faible solubilité dans l'eau et leur tendance à l'oxydation sont des obstacles qui limitent leur utilisation pratique (Moretti et al., 1998). Pour remédier à ces problèmes, les pesticides à base d'huiles essentielles doivent être formulés de manière à stabiliser ces composés actifs (Markus, 1996). Les formulations peuvent prendre la forme de systèmes liquides classiques, tels que des solutions ou des dispersions aqueuses et non aqueuses, ou de systèmes solides comme des poudres mouillables et des granulés dispersables dans l'eau. Des systèmes à libération contrôlée sont également envisagés pour optimiser l'efficacité des huiles essentielles et minimiser leur dégradation. Ces stratégies de formulation visent à prolonger la durée d'action des huiles essentielles, à améliorer leur stabilité et à faciliter leur application, rendant ainsi leur utilisation plus viable et efficace dans les programmes de gestion des nuisibles (Moretti et al., 2002).

Mécanisme d'action

Les HEs sont reconnues pour leurs propriétés insecticides, qui s'expliquent par une série de mécanismes d'action complexes et variés. Ces mécanismes sont principalement attribuables aux composés bioactifs présents dans les HEs, tels que les terpènes, les phénols et les alcools, qui agissent de manière synergique pour exercer des effets toxiques sur les insectes nuisibles (Isman, 2000).

Les HEs et leurs composants affectent les processus biochimiques, ce qui perturbe spécifiquement l'équilibre endocrinologique des insectes. Elles peuvent être neurotoxiques ou agir comme des régulateurs de croissance des insectes, perturbant le processus normal de morphogenèse. Le caractère lipophile des HEs joue un rôle clé dans la modulation de l'activité insecticide et particulièrement l'effet larvicide. L'association entre les composés lipophiles et la désactivation des protéines/l'inhibition des enzymes peut être une explication raisonnable de ce fait. Les doubles liaisons sont importantes dans l'activité larvicide des molécules naturelles

car l'hydrogénation de ces liaisons diminue le caractère lipophile de ces composés, limitant ainsi leur passage. Par exemple, le β - pinène, qui possède une double liaison exocyclique, est plus toxique pour les larves d'*Aedes aegypti* que le α -pinène, qui possède une double liaison endocyclique (Pavela, 2015).

La neurotoxicité de plusieurs monoterpénoïdes (d-limonène, myrcène, terpinéol, linalol et pulégone) a été évaluée sur la mouche domestique ainsi que sur la blatte allemande (Coats et al., 1991). La toxicité des huiles essentielles ou de leurs composants chez les insectes et autres arthropodes indique un mode d'action neurotoxique ; les symptômes les plus importants sont l'hyperactivité suivie d'une hyper-excitation, conduisant à un arrêt rapide et à l'immobilisation (Enan, 2001).

L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) joue également un rôle clé dans la modulation de l'activité larvicide. Plusieurs monoterpènes et HEs se sont révélés être des inhibiteurs de l'AChE contre différentes espèces d'insectes. Par exemple, les HE de Zingiber officinale modifient le comportement et la mémoire dans le système cholinergique (Felipe et al., 2008), tandis que le linalol a été identifié comme un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (Ryan & Byrne, 1988). Une autre cible possible suggérée pour les HE est l'interférence avec les canaux de chlorure GABA chez les insectes (Rattan, 2010). L'octopamine (OA) est également une cible de l'activité des HEs chez les insectes. L'OA est une amine biogène multifonctionnelle naturelle qui joue un rôle clé en tant que neurotransmetteur, neuromodulateur et neurohormone dans le système des invertébrés, avec une fonction physiologique comparable à celle de la norépinéphrine chez les vertébrés (Enan, 2001).

Les HEs interfèrent avec la respiration des insectes en obstruant les spiracles ou en perturbant la chaîne de transport des électrons mitochondriale, ce qui réduit la production d'ATP, la principale source d'énergie cellulaire. En interférant avec cette chaîne de transport, les HEs réduisent la production d'ATP, perturbant ainsi le métabolisme énergétique des insectes (Wang et al., 2018).

V.5. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés ou des systèmes capables d'interagir en toute sécurité avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Ils peuvent utiliser plusieurs mécanismes : (i) piéger les espèces qui déclenchent la peroxydation, (ii) chélater les ions métalliques afin qu'ils ne puissent pas générer d'espèces réactives ou décomposer les peroxydes, (iii) éteindre $\cdot\text{O}_2$ en empêchant la formation

de peroxydes, (iv) interrompre la réaction en chaîne auto-oxydative, et/ou (v) réduire les concentrations d'O₂ localisées ([Asimi et al., 2013](#)).

L'efficacité antioxydante de ces composés bioactifs dépend de leurs caractéristiques chimiques et de leur emplacement physique dans l'aliment (proximité des phospholipides membranaires, interfaces d'émulsion ou dans la phase aqueuse). Les antioxydants (par ex, flavonoïdes, acides phénoliques, tanins, vitamine C, vitamine E) ont diverses propriétés biologiques, telles que des effets anti-inflammatoires, anti-cancérigènes et anti-athérosclérotiques, et réduisent également l'incidence des maladies coronariennes ([Diaz et al., 1997](#) ; [Bartoszczek & Polak, 2012](#) ; [Poznyak et al., 2020](#) ; [Hamrouni-Sellami et al., 2012](#))

Diverses méthodes ont été développées pour évaluer l'efficacité antioxydante des molécules bioactives, parmi lesquelles les tests au DPPH et à l'ABTS sont les plus fréquemment utilisés. Ces tests permettent de mesurer la capacité antioxydante des composés bioactifs.

Sur le plan de la chimie de la conversion des antioxydants, les mécanismes d'action biologiques se regroupent souvent en trois principaux modes d'action ([Bibi Sadeer et al., 2020](#) ; [Ivanova et al., 2020](#) ; [Platzer et al., 2021](#)):

(i) les réactions de transfert d'électrons de l'antioxydant au substrat (réaction d'oxydation de l'antioxydant), c'est-à-dire le mécanisme TE (transfert d'électron) ;

(ii) les réactions de transfert d'un atome d'hydrogène de l'antioxydant vers un substrat qui, en milieu aqueux, peuvent être considérées comme un transfert de proton accompagné d'une réaction d'oxydation de l'antioxydant, peuvent être considérées comme un transfert de protons accompagné d'un transfert d'électrons (réaction d'oxydation de l'antioxydant), c'est-à-dire le mécanisme TAH (transfert d'Atome d'Hydrogène) ;

(iii) les réactions de transfert d'une ou de plusieurs paires d'électrons avec formation d'une liaison covalente par le mécanisme donneur-accepteur (réaction de transfert d'électrons), c'est-à-dire le mécanisme TAH par le mécanisme donneur-accepteur (réaction de complexation de l'antioxydant avec des ions métalliques de valence variable), c'est-à-dire le mécanisme de chélation.

V.6. Activité anti-acétylcholinestérase

V.6.1. AChE

L'acétylcholine (ACh), que l'on retrouve chez les vertébrés et les arthropodes, est l'un des composés majeurs permettant la transmission des impulsions électriques des cellules nerveuses vers une autre cellule nerveuse ou vers les muscles, qu'ils soient volontaires ou involontaires. Elle a été identifiée pour la première fois en 1867 en tant que composé synthétique et a été repérée dans les tissus humains en 1906 dans des extraits de la glande surrénale dont l'adrénaline avait été éliminée. On distingue deux principaux types de récepteurs réagissant à l'acétylcholine : les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques ([Houghton et al., 2006](#)).

Les récepteurs muscariniques sont principalement liés au système nerveux périphérique ainsi qu'aux muscles lisses et cardiaques. Leur interaction avec l'acétylcholine est généralement associée à la stimulation du système nerveux parasympathique. Les symptômes typiques de cette stimulation parasympathique comprennent la réduction du rythme cardiaque et de la pression artérielle, la contraction des bronches, l'augmentation de la salivation, la stimulation de la digestion et l'accroissement du péristaltisme intestinal, l'évacuation des fluides de la vessie et l'adaptation des yeux pour la vision rapprochée, accompagnée d'une contraction des pupilles ([Silman & Sussman, 2005](#)).

Les récepteurs nicotiniques sont localisés dans le système nerveux central (SNC) et dans les plaques motrices terminales, qui représentent les synapses entre les nerfs et les muscles squelettiques. Dans le SNC, l'activation des récepteurs nicotiniques par l'acétylcholine semble liée aux processus cognitifs et à la mémoire. Quant aux muscles squelettiques, leur stimulation par l'acétylcholine entraîne une contraction ([Silman & Sussman, 2005](#)).

L'acétylcholine (ACh) est conservée dans des structures appelées vésicules, situées aux extrémités des cellules nerveuses. Lorsque ces terminaisons nerveuses sont dépolarisées, leur contenu est libéré et l'ACh se déplace dans la synapse pour se lier au récepteur. L'ACh libérée a une durée de vie très courte en raison de la présence d'une grande quantité d'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme qui décompose la liaison ester de la molécule, entraînant ainsi une perte de son activité stimulante. Par conséquent, l'inhibition de l'AChE prolongera la durée de vie et donc l'activité de l'ACh en ce qui concerne la transmission nerveuse. Ce principe a été utilisé en médecine pour traiter des conditions pathologiques liées

à des niveaux insuffisants d'ACh, et entoxicoLOGIE pour provoquer des maladies ou la mort par une stimulation cholinergique (Silman & Sussman, 2005).

Il est important de souligner que récemment, l'acétylcholinestérase (AChE) a été associée à plusieurs fonctions autres que la transmission nerveuse. En particulier, elle agit comme une protéine d'adhésion, une protéine de la matrice osseuse, elle participe à la croissance des neurites et à la production de fibrilles amyloïdes. Ces dernières sont typiquement présentes dans les cellules cérébrales des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Zhang, 2004).

L'impact sur les fonctions de l'acétylcholinestérase (AChE) qui ne sont pas liées à la transmission nerveuse est plus complexe à anticiper. Cependant, il a été suggéré que les inhibiteurs de ces aspects de sa fonction pourraient mériter d'être étudiés dans la recherche de nouveaux médicaments (Silman & Sussman, 2005).

V.6.2. BChE

La butyrylcholinestérase (BChE, EC 3.1.1.8), autrefois désignée sous le nom de pseudocholinestérase, est une enzyme principalement synthétisée dans le foie et largement distribuée dans l'organisme, notamment dans le sang (à une concentration d'environ 5 µg/mL), les synapses des jonctions neuromusculaires, les cellules gliales et les axones de la substance blanche cérébrale. Cette enzyme existe sous de nombreuses variantes alléliques, comme l'a souligné Massoulié en 2002.

Historiquement, la BChE a été considérée comme un analogue vestigial non fonctionnel de l'acétylcholinestérase (AChE). Cependant, des découvertes récentes ont remis en question cette vision, suggérant que la BChE pourrait jouer un rôle plus significatif. Par exemple, chez le souris, la quantité totale de BChE dans l'organisme est dix fois supérieure à celle de l'AChE, comme l'ont démontré Duysen et al., en 2001. De plus, des études ont montré que l'activité de la BChE dans le sang total humain est significativement plus élevée que celle de l'AChE (Worek et al., 2008). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que la BChE pourrait jouer un rôle complémentaire en cas d'activité insuffisante de l'AChE dans la neurotransmission. Cette hypothèse est soutenue par des études sur la physiologie des souris knock-out pour l'AChE (Duysen et al., 2001). Il a également été suggéré que la BChE pourrait agir comme une barrière pour empêcher la diffusion de l'ACh dans la circulation sanguine (Massoulié, 2002). Cependant, malgré ces indications, des preuves expérimentales concluantes faisant état du rôle précis de la BChE font encore défaut. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour élucider le rôle exact de la BChE dans l'organisme. La compréhension

de ces mécanismes pourrait avoir des implications significatives dans divers domaines, notamment la neurobiologie, la pharmacologie et la médecine. En particulier, elle pourrait aider à élucider les mécanismes sous-jacents de certaines pathologies neurologiques et à développer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'activité antiacétylcholinestérase (AChE) des HEs est un domaine de recherche qui a suscité un intérêt considérable en raison du potentiel de ces composés naturels dans le traitement des troubles neurodégénératifs, tels que la maladie d'Alzheimer, ainsi que dans la gestion des populations d'insectes nuisibles. Les HEs sont composées d'un large éventail de composés volatils, dont certains ont démontré une capacité à inhiber les enzymes AChE et butyrylcholinestérase (BChE), qui sont responsables de la dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur essentiel pour la fonction cognitive et la signalisation neuromusculaire (Perry et al., 2000).

Des études ont identifié plusieurs molécules présentes dans les HEs qui agissent comme inhibiteurs de l'AChE et de la BChE. Un exemple notable est l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis*), qui contient des composés tels que le 1,8-cinéole, le camphre et l'acide rosmarinique. Ces molécules ont démontré une activité inhibitrice significative contre l'AChE et la BChE, comme l'indiquent les études d'Orhan et ses collègues (2011), qui ont mis en évidence le potentiel thérapeutique du romarin dans la modulation de l'activité cholinestérasique. De même, l'huile essentielle de sauge (*Salvia officinalis*) est riche en composés tels que l' α -thuyone et le camphre, qui ont également montré des effets inhibiteurs sur l'AChE et la BChE, suggérant leur utilité potentielle dans l'amélioration de la fonction cognitive (Perry et al., 2000).

Une autre étude menée par Savelev et al. (2003) a révélé que l'huile essentielle de *Salvia leriifolia* possède des propriétés inhibitrices de l'AChE, attribuées principalement à ses composants monoterpénoïdes, tels que le 1,8-cinéole et le camphre. Ces découvertes renforcent l'idée que certaines huiles essentielles et leurs composants moléculaires pourraient être utilisés comme agents neuroprotecteurs. Il est important de noter que, bien que les huiles essentielles montrent un potentiel prometteur en tant qu'inhibiteurs de l'AChE et de la BChE, leur utilisation en tant que traitements thérapeutiques nécessite une compréhension approfondie de leur mécanisme d'action, de leur biodisponibilité et de leur toxicité.

Dans une étude de Jukic et al. (2007), le thymol a montré une forte activité inhibitrice, ce qui suggère que l'huile essentielle de thym pourrait être bénéfique dans la gestion des troubles

neurodégénératifs. Il est également intéressant de noter que les HEs peuvent agir de manière synergique pour améliorer leur efficacité. Une étude de [Loizzo et al. \(2009\)](#) a examiné les effets combinés de différentes HEs et a constaté que les mélanges peuvent parfois offrir une activité inhibitrice supérieure à celle des huiles individuelles.

Outre leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, anticholinestérase, insecticides et herbicides déjà documentées, les HEs se distinguent également par d'autres activités biologiques remarquables. Elles possèdent des effets antiviraux, antioxydants et anti-inflammatoires, contribuant à la protection contre les infections virales, le stress oxydatif et les réponses inflammatoires excessives. De plus, certaines huiles essentielles ont démontré des propriétés analgésiques et anxiolytiques, offrant des perspectives intéressantes pour la gestion de la douleur et de l'anxiété.

En plus de leurs multiples activités biologiques, les huiles essentielles jouent un rôle significatif dans les interactions biotiques, agissant comme agents de communication chimique entre les organismes. Elles peuvent fonctionner comme des répulsifs ou des attractifs pour divers insectes, influençant ainsi les dynamiques de pollinisation et de prédation. Les huiles essentielles peuvent également moduler les interactions entre les plantes et les microbes du sol, favorisant la croissance des plantes et la résistance aux pathogènes. Ces interactions complexes mettent en lumière le potentiel des huiles essentielles dans l'agroécologie et la gestion intégrée des nuisibles.

VI. Descriptionsdesplantesétudiées

VI.1. A-*Pinusnigrassp.mauretanica*

VI.1.1. Synonymieet noms vernaculaires

Pinusnigra estconnusousdifférentsnoms; enanglaisAustrianBlackPineouBlackPine, enallemandsouslenomdeSchwarzkiefer, enespagnolcommePinonegro, enfrançais sous le nom de Pin noir et en italien sous le nom de Pino nero. Localement en kabyle pour la sous espèce*Pinusnigrassp.mauretanica*, c'est toujours lenomcommun donné à toutes les espèces de pins : Azombay.

Lebasidionymepournotresousespèceest:

- *Pinusnigravar.mauretanica* Maire&Peyerimh.[1927]

- *Pinusnigrasubsp.mauretanica*(Maire&Peyerimh.)Heywood[1962]

Comme pour la majorité des plantes surtout du pourtour méditerranéen, plusieurs synonymes sont proposés par des auteurs différents :

▪ *Pinusclusianasubsp.mauretanica*(Maire&Peyerimh.)Maire [1952]

▪ *Pinusnigrasubsp.laricio*auct. [1928]

▪ *Pinusnigravar.mauretanica* Maire&Peyerimh.[1927]

▪ *Pinusnigrasubsp.salzmanni*auct.

▪ *Pinusnigravar.mauretanica*(Maire&Peyerimh.)Farjon

▪ *Pinus pyrenaica* auct.

• *Pinuspyrenaicasubsp.mauretanica*(Maire&Peyerimh.)O.Schwartz[1939]

Dobignard&Chatelain(2010- 2013)

VI.1.2. Taxonomieet systématique

Vu que les positions phylogénétiques de certains taxons restent controversées ou n'ont pas été complètement résolues surtout pour les Gymnospermes, nous avons présenté ici une classification phylogénétique simplifiée. Cela s'applique également pour l'autre espèce étudiée *Abies numidica* (**Figure 17**). Nous avons également dressé un tableau synthétique de la classification classique (**Tableau 1**)

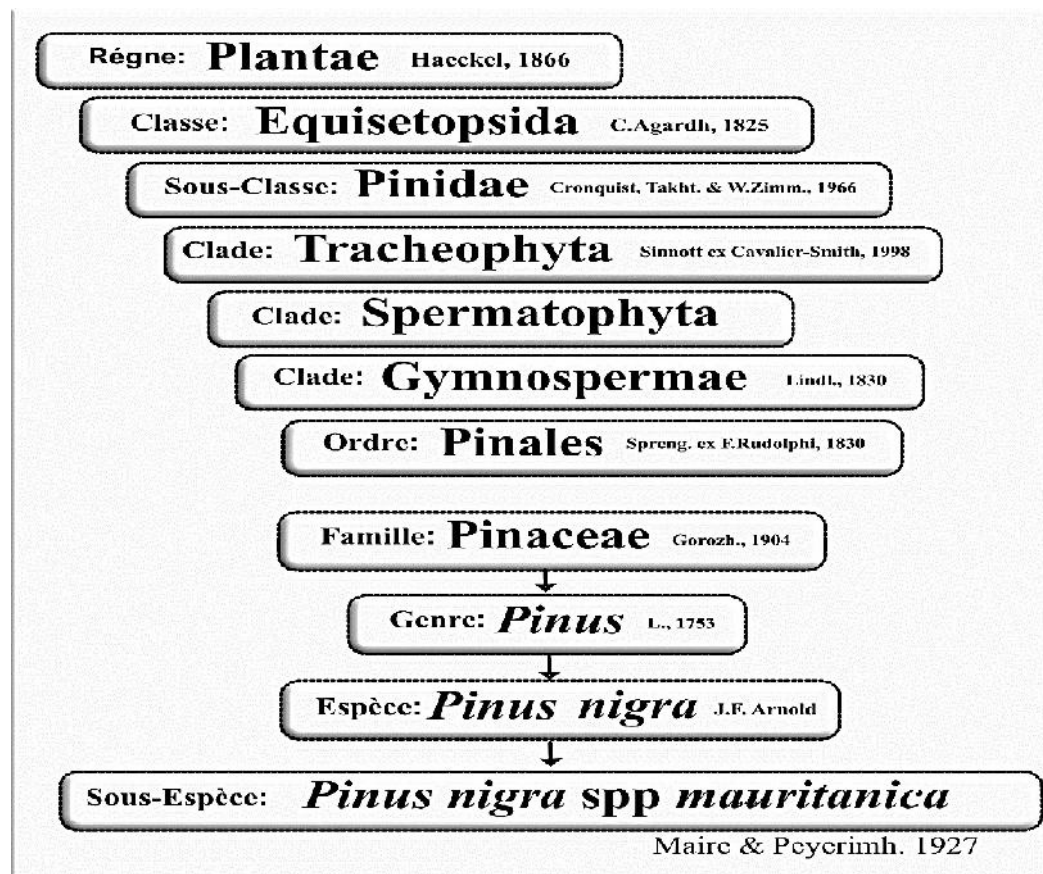


Figure17:Position phylogénétique de *Pinus nigra* spp. *mauritanica*

Tableau1 :Position systématique de *Pinus nigra* spp. *mauritanica*

Rang	Nom scientifique
Clade	Plantae
Clade	Plasmodesmophytes
Clade	Embryophytes
Clade	Stomatophytes
Clade	Hemitracheophytes
Clade	Tracheophytes
Clade	Euphyllophytes
Clade	Spermatophytes
Clade	Gymnospermes
Clade	Pinophytes
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Genre	Pinus
Espèce	<i>Pinus nigra</i>
Sous-espèce	<i>Pinus nigra</i> spp. <i>mauritanica</i>

VI.1.3. Descriptionbotanique

Le pin noir est un grand conifère atteignant couramment 20-30 m, mais exceptionnellement, il est capable d'atteindre un diamètre de 2 m et des hauteurs jusqu'à 50 m. Il possède un tronc se dénudant longuement, se couvrant d'un rhytidome gris brun profondément fissuré sur les arbres plus âgés. Son écorce est généralement brun grisâtre à noir d'où son nom latin "nigra" (**Figure 18, d**). C'est un arbre à branches étalées portant des feuilles vert foncé par deux de 8-15 cm de longueur, persistant quatre ans, plus ou moins raides, $\pm$ épaisses, à marges finement denticulées, à sommet pointu rigide, à nombreuses lignes stomatiques sur chaque face et à canaux résinifères médians. Les cônes sont subsessiles, jaune-brun, solitaires ou agglomérés, ovoïdes-coniques (**Figure 18, b**), 5-8 x 2,5-3 cm, squames à apophyse carénée transversalement, à apex mutique ou $\pm$ apiculé. Les graines sont brunes $\pm$ mouchetées de noir, 5-7 mm avec une aile 3-4 fois plus longue (**Maire, 1952**). Chez les jeunes individus, la cime est conique (**Figure 18, a**) devenant en parapluie chez les arbres plus âgés (**Figure 18, c**). Les cônes mûrissent pendant l'automne de la deuxième année, et ouvrent la troisième année. Ces cônes contiennent 30 à 40 graines.

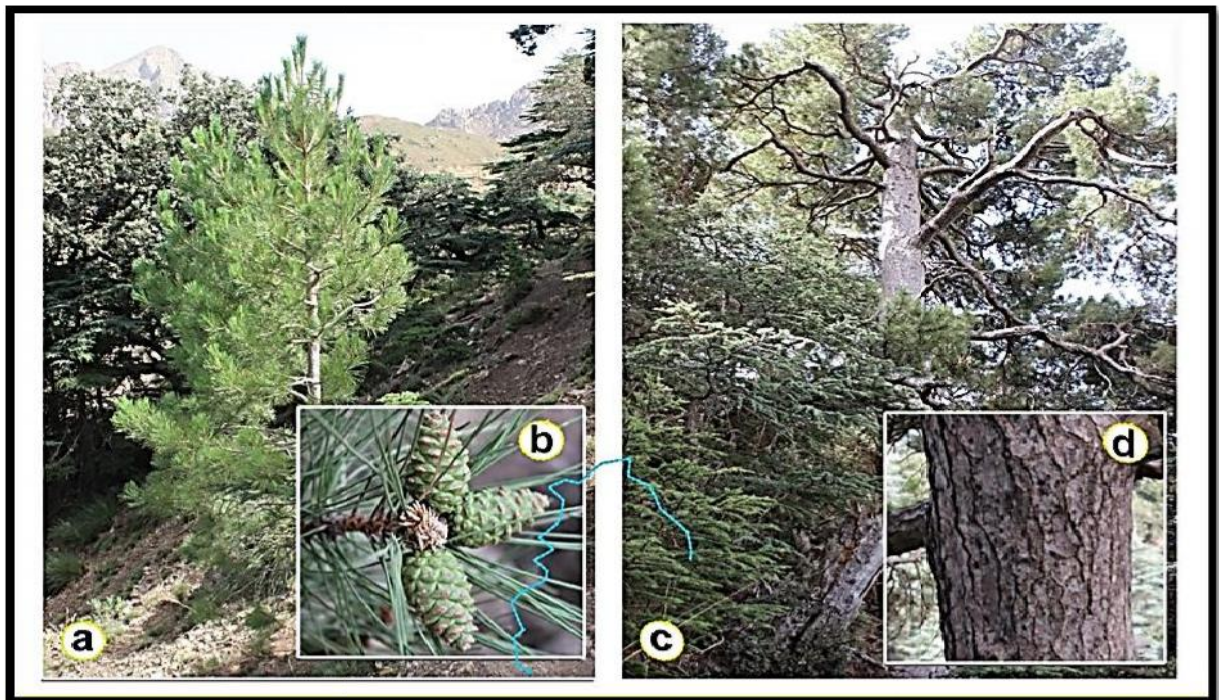


Figure 18: *Pinus nigra* ssp. *mauretanica*. Jeune souche (a) et cônes femelles immatures (b). Vieux sujet (c) et détail du tronc (d) (Crédits photos: Adjaoud Abdenour, 2009).

VI.1.4. Diversité, Ecologie et répartition géographique

Pinus est un des genres appartenant à une des plus diverses familles d'arbres à feuilles persistantes. Les Pins sont considérés comme l'un des composants majeurs des paysages forestiers des régions tempérées (Farjon, 2018). Selon Keeley (2012), on dénombre plus de 100 espèces principalement réparties dans l'hémisphère Nord. Ces estimations diffèrent légèrement d'un auteur à l'autre et selon Farjon, (2021), cette famille comprend un nombre plus élevé estimé à environ 120 espèces. Les principaux genres de Pins comprennent *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga* et *Tsuga*. Chaque genre comprend plusieurs espèces, qui se différencient par leur taille et leur forme de couronne, la couleur et la durée de vie des aiguilles, la taille et la forme des bourgeons, la couleur et la forme des cônes, leur maturité et leur odeur. Le genre *Pinus* comprend des espèces telles que *Pinus halepensis*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra*, *Pinus monticola*, *Pinus patula* et *Pinus mugo*.

Pinus nigra comprend plusieurs sous-espèces dont les plus communes sont *Pinus nigra* subsp. *nigra* (Pin noir), *Pinus nigra* subsp. *laricio* (Pin laricio) et *Pinus nigra* subsp. *salzmannii* (Pin de Salzmann). *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* est un conifère endémique des montagnes côtières du nord-ouest de l'Afrique (Algérie, Maroc). Au Maroc, il est principalement répandu dans les régions montagneuses de l'Atlas, le Moyen Atlas et l'Anti-Atlas, à des altitudes allant jusqu'à 2000 m. Il est également présent à des altitudes inférieures dans les régions plus septentrionales du Maroc, telles que le Rif et l'Oriental. C'est un arbre de montagne qui préfère les sols calcaires ainsi que les sols pauvres et secs. Il aime la lumière du soleil et tolère des températures élevées et des précipitations relativement faibles. Il peut vivre jusqu'à 600 ans et atteindre une hauteur de 60 mètres.

En Algérie, il pousse sur les hautes montagnes en Kabylie. Le peuplement naturel unique de la sous-espèce étudiée *P. nigra* ssp. *mauretanica* n'est limité qu'à une petite parcelle dans la réserve naturelle du parc national du Djurdjura (Figure 19). La croissance de *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* est très lente, mais sa longévité est significative. En raison de sa distribution restreinte et de ses faibles ressources génétiques, la sous-espèce est classée comme en voie de disparition selon l'Union internationale pour la conservation de la nature (UICN). Des mesures de conservation doivent être prises pour protéger cette espèce et augmenter sa résilience aux changements climatiques.

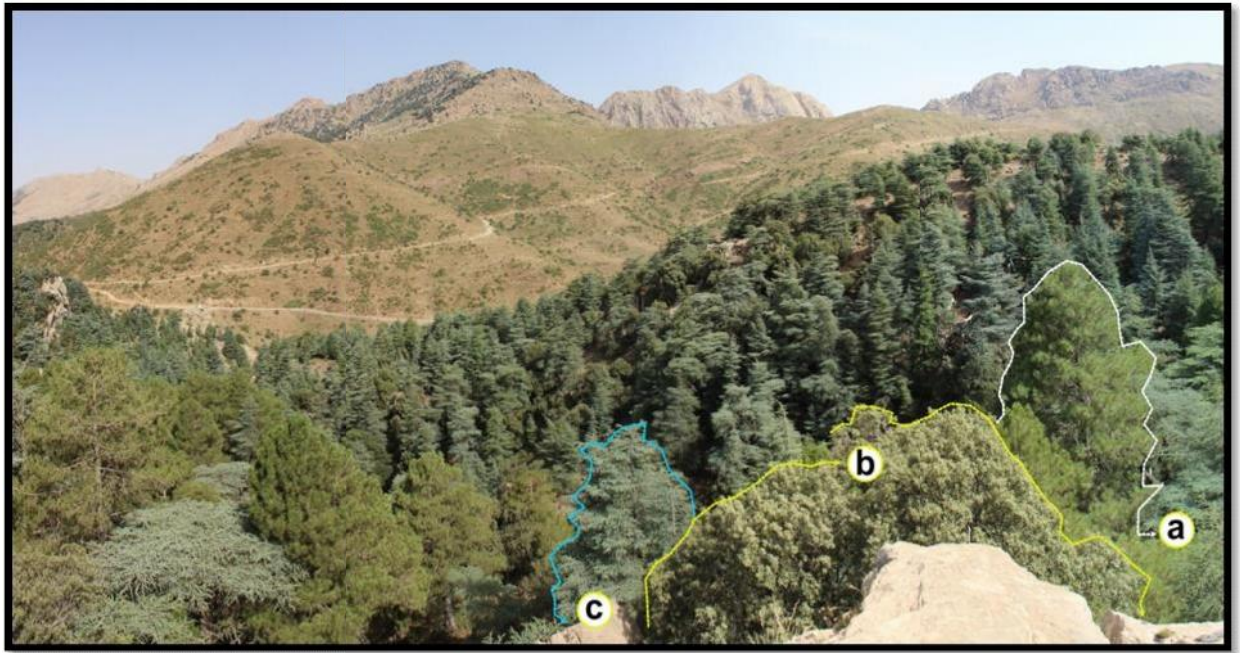


Figure19: Vued'unepartiedupeuplementnaturelde *Pinusnigrassp.mauretanica*(a) en mélange avec le cèdre. Réserve parc national du Djurdjura (1548 m). (Crédits photos : AdjaoudAbdenour,2009)

VI.2. *Abies numidica*

VI.2.1. Synonymieet noms vernaculaires

Abies numidica est connue sous les noms vernaculaires de Sapin de Numidie ou Sapin de l'Atlas, en français. Dans d'autres langues, Pinonúmido en espagnol, Numidian Fir ou Algerian Fir en anglais et Föhre aus Numidien en allemand. En Kabyle, Tumert. Le nom scientifique retenu et unique est *Abies numidica* L'annoy ex Carrière, 1866. Aucun synonyme n'est proposé pour cette espèce et jusqu'à présent aucun taxon inférieur n'est référencé.

VI.2.2. Taxonomieet systématique

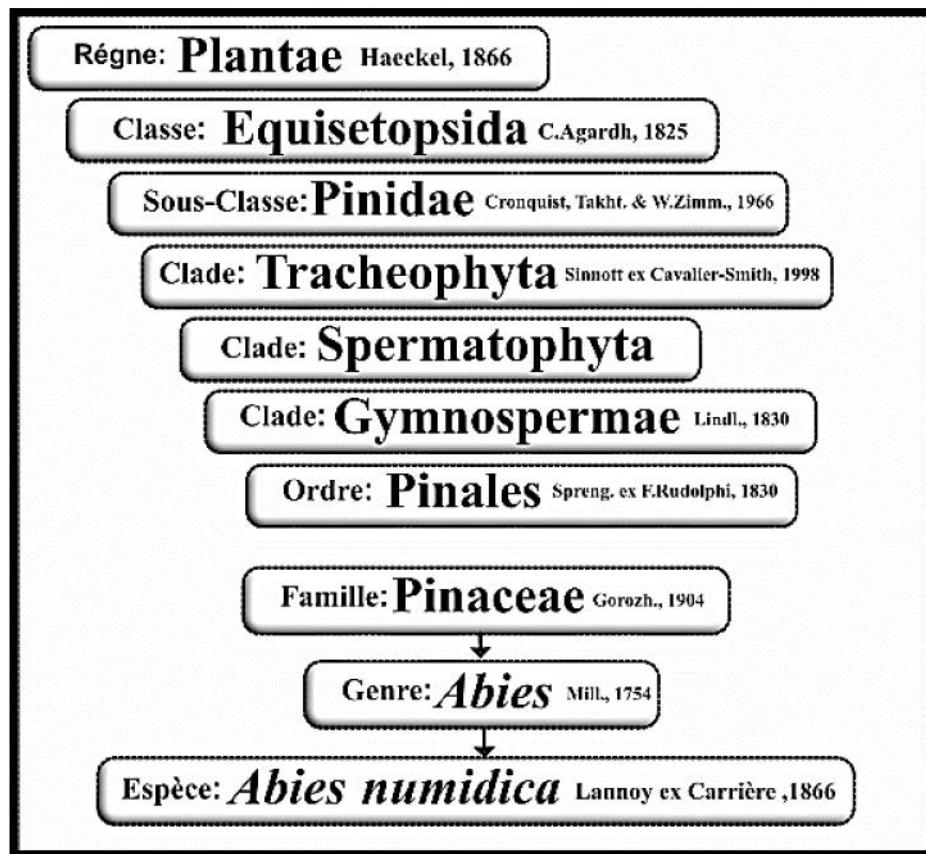


Figure20:Positionphylogénétique'd'*Abiesnumidica*

Tableau2:Positionsystématique'd'*Abiesnumidica*

Rang	Nomscientifique
Clade	Plantae
Clade	Plasmodesmophytes
Clade	Embryophytes
Clade	Stomatophytes
Clade	Hemitracheophytes
Clade	Tracheophytes
Clade	Euphyllophytes
Clade	Spermatophytes
Clade	Gymnospermes
Clade	Pinophytes
Ordre	Pinales
Famille	Pinaceae
Genre	Abies
Espèce	<i>Abiesnumidica</i>

VI.2.3. Descriptionbotanique

Abies numidica est une espèce endémique d'Algérie, décrite par **Maire** en 1952 et **Quezel & Santa** en 1965. Il s'agit d'un conifère de grande taille pouvant atteindre 23 m, arbre à cime pyramidale(**Figure 21, c**) avec un tronc de 1 m de diamètre à écorce lisse, grisâtre puis couvert d'un rhytidome crevassé-écailleux ; brun noir et à feuillage persistant. Les feuilles en forme d'aiguilles sont linéaires-lancéolées, de couleur vert foncé, à bout pointu et à bords légèrement dentés. Les aiguilles des rameaux inférieurs et moyens sont plus ou moins aplaties dans un plan, celles des rameaux supérieurs dressées en brosse sur la face supérieure du rameau (**Figure 21, d**). Les cônes sont cylindriques, obtus, 13-20 x 4 cm de long (**Figure 21, a**), à écailles très aplaties(**Figure 21, b**) et à bord légèrement recourbé. Sa floraison est au printemps et sa fructification en automne (**Maire, 1952**).

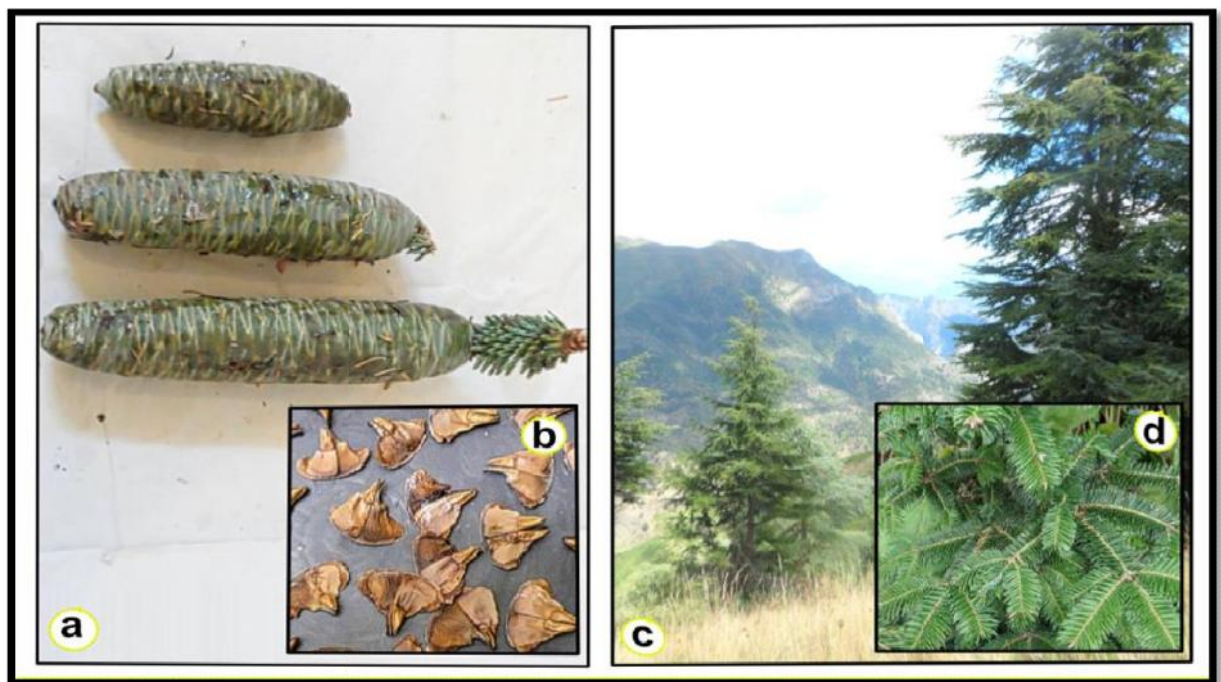


Figure 21 : *Abies numidica*. Cônes femelles immatures recouverts de résine (a) et écailles aplaties de cônes femelles matures (b). Jeune souche (c) et détails des rameaux (d)

(Crédits photos: Adjaoud Abdenour, 2011).

VI.2.4. Diversité, Ecologie et répartition géographique

Le genre *Abies* comprend environ 50 espèces d'arbres à aiguilles connus sous le nom de sapin. Certaines sont relativement communes, comme *l'Abies alba*, qui est largement cultivée dans certaines parties de l'Europe et de l'Amérique du Nord. D'autres sont plus rares, comme *l'Abies nordmanniana*, qui est endémique en Asie occidentale et en Turquie (**Xian et al.,**

2007). Il y a aussi de nombreuses espèces qui sont très localisées, comme l'*Abies numidica*, qui ne pousse que dans les montagnes du nord de l'Algérie, Kabylie. Les *Abies* sont généralement des arbres à feuilles persistantes, à croissance lente qui peuvent atteindre des hauteurs remarquables. La plupart des *Abies* sont des arbres de montagne, trouvés dans les régions montagneuses du monde entier. Certains genres de sapin poussent également dans des forêts plus basses et plus tempérées (Xiang et al., 2007). *Abies numidica* qui est un arbre endémique à l'Algérie, Kabylie, est restreint au massif des Babors entre 1300 et 2000 m d'altitude et Tababort (Figure 22), où il est moins abondant, localisé essentiellement sur les pentes escarpées et rocheuses du versant Nord (Figure 22, a). D'après Quézel, (1956), il occupe seulement 300 hectares ; une donnée ancienne qui reste à actualiser. C'est une espèce menacée de disparition selon l'UICN (Red List, 2011).

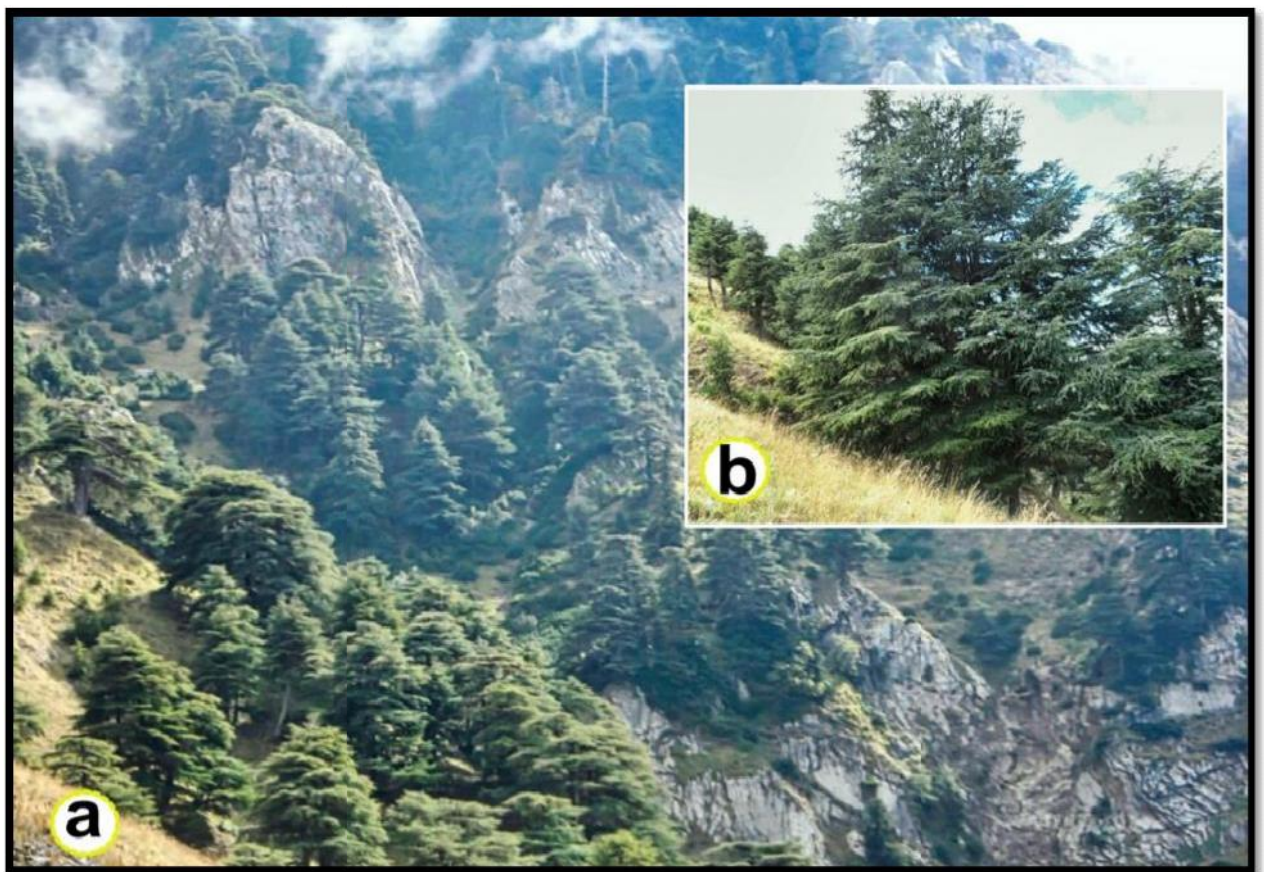


Figure 22: Vue d'une partie du peuplement naturel d'*Abies numidica* du mont Tababort sur pentes escarpées et pierreuses (a) Détail d'ambiance forestière (b) (Crédits photos: Adjaoud Abdenour, 2011).

VI.2.5. Utilisation en médecine traditionnelle

Les cônes du sapin de Numidie sont utilisés en médecine traditionnelle contre le rhume, les douleurs abdominales, les maladies respiratoires et les maladies vasculaires tandis que d'autres parties de la plante sont utilisées dans diverses préparations, notamment les huiles de térébenthine médicinales et l'extraction de goudron. La gomme de sapin est utilisée comme antiscorbutique et antiseptique, ou pour le traitement des plaies et l'apaisement des brûlures (**Illoul-Hachi, 2016**). Jusqu'à présent, aucune étude ethnobotanique n'a été entreprise pour clarifier les utilisations traditionnelles d'*A. numidica*, d'ailleurs autour de son aire de répartition.

VI.2.6. Données phytochimiques et pharmacologiques

Plusieurs études ont révélé le potentiel thérapeutique des huiles essentielles issues des espèces d'*Abies*. Cependant, peu d'études ont été publiées sur *A. numidica*. Certaines études

sur l'espèce ont traité surtout les aspects phytosociologiques, écophysiologiques et de conservation (**Kolai, 1990 ; Fady, 2007 ; Bennadja & Tlili-Ait Kaki, 2012 ; Illoul-Hachi et al., 2015**). Néanmoins, une première littérature s'est développée sur les profils phytochimiques, antioxydants et antimicrobiens (**Tlili-Ait Kaki et al., 2013 ; Ghadbane et al., 2012 ; Ramdani et al., 2014 ; Belhadj-Mostefa et al., 2017 ; Benouchenne et al., 2021**).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aharoni A., Giri A.P., Verstappen F.W., Bertea C.M., Sevenier R., Sun Z., Jongsma M. A., Schwab W. and Bouwmeester, H. J. (2004). Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. *The Plant cell*, 16 (11), 3110-3131.
2. Ali RM., Houghton PJ. and Hoo TS. (1998) Antifungal activity of some Bignoniaceae found in Malaysia. *Phytotherapy Research*, 12, 331-334.
3. AliB.,Al-WabelN.A.,ShamsS.,AhamadA.,KhanS.A.,andAnwarF.(2015).Essential oilsusedinaromatherapy:Asystemicreview. *AsianPacificJournalofTropicalBiomedicine*, 5 (8), 601-611.
4. AmriI.,HamrouniL., HananaM.andJamoussiB.(2013).Reviewsonphytotoxiceffects of essential oils and their individual components: news approach for weeds management. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical technology*, 4(1), 96-114.
5. Alvarez-Castellanos PP., Bishop CD. and Pascual-Villalobos MJ. (2001) Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry*, 57, 99-102.
6. AmvamZolloPH.,BiyitiL.,TchoumboungangF.,MenutmC.,LamatyG.andBouchetP. (1998). Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 107-114.
7. Angelini L.G., Carpanese G., Cioni P.L., Morelli I., Macchia M. and Flamini G. (2003). Essential oils from Mediterranean Lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6158–6164.
8. AppendinoG.,Taglialatela-ScafatiO.,RomanoA.,PollastroF.,AvontoC.andRubiolo, P. (2009). Genepolide, a sesterpene γ -lactone with a novel carbon skeleton from mountain wormwood (*Artemisia umbelliformis*). *Journal of Natural Products*, 72 (3), 340-344.
9. Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson, Paris. 700 p.
10. Ashour M., Wink M. and Gershenzon J. (2018). Biochemistry of terpenoids: Monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Annual Review of Plant Biology*, 15, 258–303.
11. Asimi O.A., Sahu N.P. and Pal A.K. (2013). Antioxidant activity and antimicrobial property of some Indian spices. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3(3), 1-8.

12. Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N. and Omar A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426- 436.
13. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. *Food and chemical toxicology*, 46 (2), 446-475.
14. Barra A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. *Natural product communications*, 4(8), 1934578X0900400827.
15. Bartoszek M. & Polak J. (2012). An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. *Food chemistry*, 132(4), 2089-2093.
16. Başer, K.H.C., & Demirci F. (2007). Chemistry of essential oils in *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, edited by Berger R.G. New York: Springer, 43-86.
17. Bathal S.S., Singh D. and Dhillon R.S. (1993). Effect of crude root oils of *Inula racemosa* and *Saussurea lappa* on feeding, survival and development of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *European Journal of Entomology*, 90(2):239-240.
18. Bazzoni E., Sanna-Passino G. and Moretti M.D.L. (2002). Essential oils and other control techniques against stored product insects. In: Majumdar D.K., Govil J.N. and Singh V.K., eds., *Recent Progress in Medicinal Plants*, Vol. 8 *Phytochemistry and Pharmacology II*. Houston, TX: Sci Tech Publishing LLC, 313-342.
19. Belhadj-Mostefa M., Abedini A., Voutquenne-Nazabadioko L., Gangloff S.C., Kabouche A. and Kabouche Z. (2017). Abietane diterpenes from the cones of *Abies numidica* De Lannoy ex Carrière (Pinaceae) and in vitro evaluation of their antimicrobial properties. *Natural Product Research*, 31 (5), 568-571, 2017.
20. Bennadja S. & Tlili-Ait Kaki Y. (2012). The Fire of Numidia: a Threatened Kind. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 12(3), 283-286, 2012.
21. Benouchenne Dj., Bellil I., Bensouici Ch., Yilmaz M.A., Akkal S., Keskinaya H.B. and Khelifi D. (2022). GC-MS Chemical profile, antioxidant ability, antibacterial effect, α -glucosidase, α -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activity of Algerian Fire essential oil. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15 (2): 303-310.
22. Bergougnoux V., Caissard J.-C., Jullien F., Magnard J.-L., Scalliet G., Cock J.M., Hugueney and Baudino S. (2007). Both the adaxial and abaxial epidermal layers of the rose petal emit volatile scent compounds. *Planta*, 226, 853-866.

23. Berthelot K., Estevez Y., Deffieux A. and Peruch F. (2012). Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie*, 94(8), 1621–1634.
24. BhatSV.,SivakumarM.,NagasampagiBA.(2005).Chemistryofnaturalproducts.Berlin: Narosa; 844 p.
25. Bibi Sadeer N., Montesano D., Albrizio S., Zengin G. and Mahomoodally M.F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety-Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9 (8), 709.
26. Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y. and Chemat F. (2009). Comparisonoftwoisolationmethodsforessentialoilfromrosemaryleaves:Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food chemistry*, 114 (1), 355-362.
27. Bousbia, N. (2011). Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produitsnaturelsetdeco-produitsagroalimentaires.Thèseenco-tutelle(Doctoraldissertation, Université d'Avignon, France). Spécialité Chimie. 128 p.
28. Boy F.R., Benito M.J., Córdoba M.D.G., Rodríguez A. and Casquete R. (2023). Antimicrobial properties of essential oils obtained from autochthonous aromatic plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20 (3), 1657.
29. Brahmksatriya P.P. & Brahmksatriya P.S. (2013). Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications. In: Ramawat, K., Mérillon, JM. (eds) Natural Products. Springer, Berlin, Heidelberg.
30. BrunetonJ.(2009).Pharmacognosie,phytochimie,plantesmédicinales(4^eéd.).Lavoisier. 1269 p.
31. BurkleL.A.andRunyonJ.B.(2016).Droughtandleafherbivoryinfluencefloralvolatiles and pollinator attraction. *Global Change Biology*, 22, 1644-1654.
32. Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International journal of food microbiology*, 94 (3), 223-253.
33. Butnariu M. & Sarac I. (2018). Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 1 (4), 35-43.
34. Carson,C.F.&RileyT.V.(1993).Antimicrobialactivityoftheessentialoilof*Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology*, 16 (2), 49-55.
35. Carson C.F., Mee B. J. and Riley T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia*(teatree)oilon*Staphylococcus aureus*determinedbytime-kill,lysis,leakage,and salttoleranceassaysandelectronmicroscopy.*AntimicrobialAgentsandChemotherapy*,46(6), 1914-1920.

36. Cavalli J.F. (2002). Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli, France. 261 p.
37. Cavanagh H.M.A. & Wilkinson J.M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy research*, 16(4), 301-308.
38. Chang, M. C. & Keasling J.D. (2006). Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nature Chemical Biology*, 2(12), 674-681.
39. Coats R., Karr L.L. and Drewes C.D., (1991). Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. Hedin, P., (Ed.), *Natural Occurring Pest Bioregulators. American Chemical Society Symposium Series*. 449 p.
40. Cosentino S.C.I.G., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M.L., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.
41. Cosimi S., Rossi E., Cioni P.L. and Canale A. (2009). Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 125-132.
42. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J. R. and Wyllie S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88 (1), 170-175.
43. Cox S.D., Mann C.M. and Markham J.L. (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 492-497.
44. Crosthwaite D. (1998). UK trade within the flavour and fragrance industry. In Proceedings of 21st International Conference on Essential Oils and Aroma's, London, England (pp. 6-12).
45. Croteau R. & Johnson M.B. (1985). Biosynthesis of terpenoid wood extractives. In: Higuchi T, editor. Biosynthesis and biodegradation of wood components. Orlando, FL: Academic Press; 1985. 379-439.
46. Croteau, R. (1986). Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. Herbs, spices, and medicinal plants: *Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology*, 1, 81-133.
47. De Billerbeck V.G., Roques C.G., Bessière J-M., Fonvieille J-L. and Dargent R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oils on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 9-17.

48. De Castro M.L., Jiménez-Carmona M.M. and Fernandez-Perez V. (1999). Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(11), 708-716.
49. De Martino L., De Feo V., Fratianni F. and Nazzaro F. (2009). Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. *Natural Product Communications*, 4 (12), 1934578X0900401226.
50. DeSousaI.P.,SousaTeixeiraM.V.,JacomettiCardosoFurtadoN.A.(2018).Anoverview of biotransformation and toxicity of diterpenes. *Molecules*, 23, 1387.
51. De Sousa D.P., Damasceno R.O.S., Amorati, R., Elshabrawy H.A., de Castro R.D., Bezerra, D.P., Nunes V.R.V., Gomes, R.C. and Lima T.C. (2023). Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. *Biomolecules*, 13, 1144
52. Degenhardt J., Köllner T. G. and Gershenzon J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70 (15-16), 1621-1637.
53. DewickP.M.(2002).ThebiosynthesisofC5-C25terpenoidcompounds. *NaturalProduct Reports*, 19 (2), 181-222.
54. Diaaz-Reinoso B., Moure S., Domianguéz H. and Parajoa J.C. (2006). Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 2441-2469.
55. Diaz M.N., Frei B., Vita J.A. and Keaney Jr J.F. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New England Journal of Medicine*, 337 (6), 408-416.
56. Djabou N., Allali H., Battesti M. J., Tabti B., Costa J., Muselli A. and Varesi L. (2012). Chemical and genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of *Teucrium scorodonia* L. *Phytochemistry*, 74, 123-132.
57. Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N. and Mnif W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* (Basel, Switzerland), 3 (4), 25.
58. Dobignard A., & Chatelain C. (2010-2013): Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord, 1-5. Conservatoire et jardins botaniques éd., Genève.
59. DormanHJD.&DeansSG.(2000)Antimicrobialagentsfromplants:antibacterialactivity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.
60. DomonkosI.,KisM.,GombosZ.andUghyB.(2013).Carotenoids,versatilecomponents of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research*, 52, 539-561

61. Dudai N., Poljakoff-Mayber A., Mayer A., Putievsky E. and Lerner H. (1999). Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *Journal of Chemical Ecology*, 25, 1079-1089.
62. Dudareva N., Negre F., Nagegowda D. A. and Orlova I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, 25(5), 417-440.
63. Duqu nois P. (1980). Les M dicaments Aromatiques, leurs caractères, leur contrôle. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 18(4), 159-168.
64. Fraga B.M. (2008). Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports*, 25(6), 1180-1209.
65. Duysen E.G., Li B., Xie W., Schopfer L.M., Anderson R.S., Broomfield C.A. and Lockridge O. (2001). Evidence for nonacetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent: supersensitivity of acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299 (2), 528-535.
66. Ebrahimi S.N., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A. and Yousefzadi M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry*, 110 (4), 927-931.
67. Edris A.E. & Farrag E.S. (2003) Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapour phase. *Food*, 47, 117-121.
68. Fady B. (2007). Utiliser le sapin d'Algérie pour sauvegarder la forêt de sapin proven ale. Rapport scientifique final. [Contrat] INRA 21A02654, hal-02816144, 2007.
69. Fahn, A. (2000). Structure and Function of Secretory Cells. In: Hallahan, D.L., Gray, J.C. and Callow, J.A., Eds., *Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology*, Volume 31, *Plant Trichomes*, Academic Press, London, 37-66.
70. Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeira F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G. and Pedro L.G. (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(1), 35-40.
71. Farjon A. (2018). The Kew Review: Conifers of the World. *Kew bulletin*, 73(1), 8.
72. Farjon A. (2021). *Pines: drawings and descriptions of the genus Pinus*. Brill.
73. Felipe C.F.B., Fons ca K.S., dos Reis Barbosa A.L., Bezerra J.N.S., Neto M.A., de Fran a Fonteles M.M. and de Barros Viana G.S. (2008). Alterations in behavior and memory induced by the essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) in mice are cholinergic-dependent. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(7), 163-170.

74. Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L. G. and Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226.
75. Jukic M., Politeo O., Maksimovic M., Milos M. and Milos M. (2007). In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21(3), 259-261.
76. Jurado A., Fernandes M., Videira R., Peixoto F. and Vicente J. (2011). Herbicides: The face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. In *Herbicides and Environment*; Kortekamp, A.E., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, pp. 3–44.
77. Hallahan D.L. (2000). Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiate plants. In: Hallahan, D.L., Gray, J.C. (Eds.), *Plant Trichomes. Advances in Botanical Research*, Vol. 31. Academic Press, London, UK, pp. 77–120.
78. Helal GA., Sarhan MM., Abu Shagla ANK. and Abou El-Khair EK. (2006) Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, lipid content and morphogenesis of *Aspergillus niger* ML2-strain. *Journal of Basic Microbiology*, 46, 456-469.
79. Hemmerlin A., Hoeffler J-F, Meyer O., Tritsch D., Kagan I.A., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M. and Bach T.J. (2003). Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 26666-26676.
80. Holley R.A. & Patel D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food microbiology*, 22 (4), 273-292.
81. Houghton P.J., Ren Y. and Howes M.J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23 (2), 181-199.
82. Illoul-Hachi M., Derridj A. and Fady B. (2015). Efficiency of seed production and cone size of *Abies numidica* De Lannoy in the plantation in Algeria. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences*, 3 (7), 9-16.
83. Illoul-Hachi M. (2016). Variabilité morpho-anatomique, diversité génétique, potentiel de régénération et efficacité de la production grainière du sapin de Numidie (*Abies numidica* De Lannoy) en plantation (cas de Serraidi) Annaba. Doctorat en Sciences Agronomiques. Option Foresterie. Département des Sciences Agronomiques. Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri. 130 p.

84. Inouye S., Wantanabe M., Nishiyama Y., Takeo K., Akao M. and Yamaguchi H. (1998) Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses*, 41, 403-410.
85. Inouye S., Tsuruoka T., Watanabe M., Takeo M., Akao M. and Yamaguchi H. (2000) Inhibitory activity of essential oils against apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*, 43, 403-410.
86. Inouye S., Uchida K. and Yamaguchi H. (2001^a) In-vitro and in-vivo anti-Trichophyton activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses*, 44, 99-107.
87. Inouye S., Takizawa T. and Yamaguchi H. (2001^b) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565-573.
88. Inouye S., Uchida K. and Abe S. (2006^a) Vapor activity of 72 essential oils against a Trichophyton mentagrophytes. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12, 210-216.
89. Inouye S., Uchida K., Takizawa T. and Yamaguchi H, Abe S. (2006^b) Evaluation of the effect of terpenoid quinones on Trichophyton mentagrophytes by solution and vapour contacts. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12, 100-104.
90. Isman M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19 (8-10), 603-608.
91. Ivanova A., Gerasimova E. and Gazizullina E. (2020). Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms. *Molecules*, 25(18), 4251.
92. Garcia G. (2017). Caractérisation chimique d'huiles essentielles de conifères introduits en Corse et de plantes endémiques de Madagascar. Doctoral dissertation, Université Pascal Paoli. France. 241 p.
93. Ghadbane G., Bounar R., Rebbas K., Medjekal S., Belhadj H., Benderradji L., Smaili T. and Harzallah D. (2016). Antioxidant and antimicrobial activities of endemic tree *Abies numidica* growing in Baborm mountains from Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 5 (1), 19.
94. Grass M-C. (2012). Chapitre 2.1. Extraction des huiles essentielles à travers l'histoire (pp:59-77) in Xavier F. & Chemat F. (2012). La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation. Ed. Vuibert. 274 p.
95. Garnero J. (1998). Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physico-chimiques. 1-3 pp.
96. Gocho S. (1992) Antifungal action of aroma chemical vapours. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 20, 585-589

97. Guenther E. (1948). The Essential Oils-Vol. 1: History-Origin in Plants Production - Analysis, reprint of 1st ed. (1948). Florida: *Krieger Publishing Company*.
98. Kalembe D.A.A.K. & Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
99. Kaloustian J. & Hadji-Minaglou F. (2012). La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. *Springer*, 206 p.
100. Kang A. & Lee T.S. (2016). Chapter 2 - Secondary metabolism for isoprenoid-based biofuels. In *Biotechnology for Biofuel Production and Optimization*; Eckert, C.A., Trinh, C.T., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 35–71.
101. Keating K. I. (1999). Allelopathy: principles, procedures, processes, and promises for biological control. *Advances in agronomy*, 67, 141-231.
102. Keeley JE. (2012). Ecology and evolution of pine life histories. *Ann For Sci*, 69(4), 445-453.
103. Keeling C.I., Weisshaar S., Lin R.P. and Bohlmann J. (2008). Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (3), 1085-1090.
104. Kolai L. (1990). La sapinière d'Abies numidica dans le Mont Babor. *Annales de la Recherche Forrestière en Algérie, INRF, Bainem*. pp. 85-97.
105. Koedam A., Scheffer J.J. and Baerheim Svendsen A. (1980). Comparison of isolation procedures for essential oils. IV. Leyland cypress. *Perfum. Flavor*, 5(7), 56-65.
106. Koedam A. (1982). The influence of some distillation conditions on essential oil composition. In *Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects* (pp. 229-236). Dordrecht: *Springer Netherlands*.
107. Lahlou M. (2004^a). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour and Fragrance Journal*, 19 (2), 159-165.
108. Lahlou M. (2004^b). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.
109. Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.

110. Landolt P.J., Hofstetter R.W. and Biddick L.L. (1999). Plant essential oils as arrestants and repellents for neonate larvae of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 28(6), 954-960.
111. Lang Q. & Wai C.M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta*, 53(4), 771-782.
112. Lange B.M. & Ahkami A. (2013). Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal*, 11(2), 169-196.
113. Larocque N., Vincent C., Belanger A. and Bourassa JP. (1999). Effects of tansy essential oil from *Tanacetum vulgare* on biology of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(6):1319-1330.
114. Lawless J. (1996). The encyclopedia of essential oils. *Element*. 226p.
115. Li Z., Howell K., Fang Z. and Zhang P. (2019). Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 247-281.
116. Liao Z., Huang Q., Cheng Q., Khan, S. and Yu X. (2021). Seasonal Variation in Chemical Compositions of Essential Oils Extracted from Lavandin Flowers in the Yun-Gui Plateau of China. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26 (18), 5639.
117. Lis-Balchin M., Deans S.G. and Eaglesham E. (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 98-104.
118. Lis-Balchin M. (2006). Aromatherapy science: a guide for healthcare professionals. *Pharmaceutical press*. 462p.
119. Llusà J., Peñuelas J., Alessio G. A. and Estiarte M. (2006). Seasonal contrasting changes of foliar concentrations of terpenes and other volatile organic compound in four dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to a field experimental drought and warming. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 632-649.
120. Loizzo M. R. Menichini F., Tundis R., Bonesi M., Conforti F., Nadjafi, F., Statti G.A., Frega N.G. and Menichini F. (2009). In vitro biological activity of *Salvia leriifolia* Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Oleo science*, 58 (8), 443-446.
121. Lucchesi M.E., Chemat F. and Smadja J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography a*, 1043 (2), 323-327.

122. Lucchesi, M. E. (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Doctoral dissertation, Université de la Réunion, France. 143 p.
123. Maire R. (1952). Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara).
124. Mander L. & Liu H.-W. (2010). Comprehensive natural products II. In Chemistry and Biology, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2010.
125. Maoka T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74, 1–16.
126. Marimuthu S., Gurusubramanian G. and Krishna S.S. (1997). Effect of exposure of eggs to vapours from essential oils on egg mortality, development and adult emergence in *Earias vittella* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Agriculture & Horticulture*, 14(4), 303-307.
127. Markus A. (1996). Advances in the technology of controlled release pesticide formulations. In: Benita S, ed., drugs and the pharmaceutical sciences, Vol. 73, Microencapsulation: *Methods and Industrial Applications*. New York, NY: Marcel Dekker; 1996:73-91.
128. Massoulié J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*, 11(3), 130-143.
129. Masyita A., Mustika Sari R., Dwi Astuti A., Yasir B., Rahma Rumata N., Emran T.B., Nainu, F. and Simal-Gandara J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food chemistry: X*, 13, 100217.
130. Monin C. (2012). Chapitre 2.2. Les techniques de distillation des plantes (pp : 78-101) in Xavier F & Chemat F. (2012). La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation. Ed. Vuibert. 274 p.
131. Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E. and Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38(5), 565-570.
132. Moreno-Mari J., Dominguez-Romero M., Oltra-Moscardó M.T. and Jimenez-Peydro R. (1999). Phytophages et faune auxiliaire associées aux plantes aromatiques en serre. In Annales de la Société entomologique de France (Vol. 35, pp. 521-524).
133. Moretti M.D., Peana A.T., Franceschini A. and Carta C. (1998). In vivo activity of *Salvia officinalis* oil against *Botrytis cinerea*. *Journal of Essential Oil Research*, 10 (2), 157-160.
134. Moretti M.D., Sanna-Passino G., Demontis S. and Bazzoni E. (2002). Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPs PharmSciTech*, 3, 64-74.

135. Morin P. & Richard H. (1985). Thermal degradation of finalyl acetate by steam distillation. Proceedings 4th Weurman Flavour Research Symposium. Elsevier Science Publishers 563-576.
136. Nakatsu T., Lupo Jr A.T., Chinn Jr J.W. and Kang R.K. (2000). Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry*, 21, 571-631.
137. Naumann K. & Isman M.B. (1995). Evaluation of neem *Azadirachta indica* seed extracts and oils as oviposition deterrents to noctuid moths. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76 (2), 115-120.
138. Orhan I.E., Senol F.S. and Sener B. (2012). Recent approaches towards selected lamiaceae plants for their prospective use in neuroprotection. *Studies in Natural Products Chemistry*, 38, 397-415.
139. Paolini J. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae* endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*. Doctoral dissertation, Université de Corse, France. Spécialité : Chimie Organique et Analytique. 333 p.
140. Park S.J., Lee S.G., Shin S.C., Lee B.J. and Ahn Y.J. (1997). Larvicidal and antifeeding activities of oriental medicinal plant extracts against four species of forest insect pests. *Applied Entomology and Zoology*, 32(4):601-608.
141. Pauli A. (2005). Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Medicinal Research Reviews*, 26, 223-268.
142. Pavela R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174-187.
143. Pereira C.G. & Meireles, M.A.A. (2010). Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess Technology*, 3, 340-372.
144. Périno-Issartier S., Abert-Vian M. and Chemat F. (2011). Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) food by-products. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1020-1028.
145. Perricone M., Arace E., Corbo M.R. Sinigaglia M. and Bevilacqua A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in microbiology*, 6, 76.
146. Perry N.S., Houghton P.J., Theobald A., Jenner P. and Perry E.K. (2000). *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(7), 895-902.

147. Pichersky E. & Gershenzon J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 237-243.
148. Pichersky E., Noel JP. and Dudareva N. (2006) Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311, 808-811.
149. Pillmoor JB., Wright K. and Terry AS. (1993). Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science*, 39, 131-140.
150. Platzer M., Kiese S., Herfellner T., Schweiggert-Weisz U., Miesbauer O. and Eisner P. (2021). Common trends and differences in antioxidant activity analysis of phenolic substances using single electron transfer based assays. *Molecules*, 26 (5), 1244.
151. Poznyak A.V., Grechko A.V., Orekhova V.A., Chegodaev Y.S., Wu W.K. and Orekhov A.N. (2020). Oxidative Stress and Antioxidants in Atherosclerosis Development and Treatment. *Biology*, 9 (3), 60.
152. Qin H.W., Yang T.M., Yang S.B., Yang M.Q., Wang Y.Z. and Zhang, J.Y. (2022). Effects of different pre-drying and drying methods on volatile compounds in the pericarp and kernel of amomum Tsao-Ko. *Frontiers in Plant Science*, 13, 803776.
153. Quézel P. (1956). Contribution à l'étude des forêts de chênes à feuilles caduques d'Algérie. Mem. Soc. Hist. Nat. Afrique du Nord, nouv. série, 1.
154. Quézel P. & Santa S. (1965). Étude phytosociologique des formations forestières du massif du Djurdjura (Algérie). *Travaux du Centre National de la Recherche Scientifique*, 207, 1-248.
155. Ramdani M., Lograda T., Chalard P. and Figueredo G. (2014). Chemical and antimicrobial properties of essential oils of *Abies numidica*, endemic species of Algeria. *International Journal of Phytopharmacology*, 5, 432-440.
156. Rattan R.S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29 (9), 913-920.
157. Reverchon E. (1997). Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, 10(1), 1-37.
158. Roberts S.C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 387-395.
159. Ryan M. F. & Byrne O. (1988). Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 1965-1975.
160. Sabarwal A., Kumar K. and Singh R.P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103-114.

161. Sangwan N.S., Farooq, A.H.A., Shabih F. and Sangwan R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*, 34, 3-21.
162. Santoyo S., Jaime L., García-Risco M.R., Ruiz-Rodríguez A., Reglero G. (2014). Antiviral properties of supercritical CO₂ extracts from oregano and sage. *International Journal of Food Properties*. 17 (5), 1150-1161.
163. Savelev S.U., Okello E.J. and Perry E.K. (2004). Butyryl- and acetyl- cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18 (4), 315-324.
164. Schmidt E. (2020). Production of essential oils (pp. 125-160). In *Handbook of essential oils*. CRC Press.
165. Sellami I.H., Rebey I.B., Sriti J., Rahali F.Z., Limam F. and Marzouk B. (2012). Drying sage (*Salvia officinalis* L.) plants and its effect on content, chemical composition, and radical scavenging activity of the essential oil. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 2978-2989.
166. Selmi S., Rtibi K., Hosni K. And Sebai H. (2022). Essential Oil, Chemical Compositions, and Therapeutic Potential. *IntechOpen*.
167. Sharifi-Rad J., Sureda A., Tenore G.C., Daglia M., Sharifi-Rad M., Valussi M., Tundis R., Sharifi-Rad M., Loizzo M. R., Ademiluyi A. O., Sharifi-Rad R., Ayatollahi S.A. and Iriti M. (2017). Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22 (1), 70.
168. Sharma N. & Tripathi A. (2006) Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 587-593.
169. Singh G. (2007). Chemistry of terpenoids and carotenoids. Discovery Publishing House. 286 p.
170. Skandamis P.N. & Nychas G.J. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022.
171. Sikkema J., de Bont J.A. and Poolman B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (11), 8022-8028.
172. Silman I. & Sussman J.L. (2005). Acetylcholinesterase : classical and non-classical functions and pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 5 (3), 293-302.
173. Singh G., Kapoor I.P.S., Pandey S.K., Singh U.K. and Singh R. K. (2002). Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. *Phytotherapy*

Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 16 (7), 680-682.

174. Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food microbiology*, 18(4), 463-470.

175. Simkin A.J., Guirimand G., Papon N., Courdavault V., Thabet I., Ginis O., Bouzid S., Giglioli-Guivarc'h N. and Clastre M. (2011). Peroxisomal localisation of the Wnal step of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*, 234, 903-914.

176. Sirousmehr A., Arbabi J. and Asgharipour MR. (2014) Effect of drought stress levels and organic manures on yield, essential oil content and some morphological characteristics of sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Biology*, 8(4):880-885

177. Soltys D., Krasuska U., Bogatek R. and Gniazdowska A. (2013). Allelochemicals as bioherbicides - Present and perspectives. In *Herbicides-Current research and case studies in use*. IntechOpen.

178. Sozer O., Komenda J., Ughy B., Domonkos I., Laczkó-Dobos H., Malec P., Gombos Z. and Kis M. (2010). Involvement of Carotenoids in the Synthesis and Assembly of Protein 172.

Subunits of Photosynthetic Reaction Centers of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 51, 823-835.

179. Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D. and Van Griensven L.J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532-7546.

180. Starmans D.A. & Nijhuis H.H. (1996). Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 7 (6), 191-197.

181. Svoboda K.P. & Svoboda T.G. (2000), Secretory structures of Aromatic and medicinal plant. *Microscopix Publications*. Powys, UK. 4. 30 p.

182. Takaichi S. (2013). Tetraterpenes: Carotenoids. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*; Ramawat, K.G., Mérillon, J., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 3251-3283.

183. Thangaleela S., Sivamaruthi B.S., Kesika P., Bharathi M., Kunaviktikul W., Klunklin A., Chanthapoon C. and Chaiyasut C. (2022). Essential oils, phytoncides, aromachology, and aromatherapy - a review. *Applied Sciences*, 12 (9), 4495.

184. Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P. and Osbourn A. (2014). Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 225-257.

185. Tlili-Ait Kaki Y., Bennadja S. and Chefrour A. (2013). Revalorisation d'une essence endémique: Le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Flora Mediterranea*, 23, 123-129.

186. Trapp S.C. & Croteau R.B. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics*, 158(2), 811-832.
187. Thulasiram H.V., Erickson, H.K., and Poulter, C.D. (2008). A common mechanism for branching, cyclopropanation, and cyclobutanation reactions in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Journal of the American Chemical Society*, 130 (6), 1966-1971.
188. Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G. and Bisignan G. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
189. Tullio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G., Cannatelli MA., Cuffini AM., Aonzo V. and Carlone NA. (2007) Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1544-1550.
190. Turek C. & Stintzing F.C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12 (1), 40-53.
191. Tworokski T. (2002). Herbicide effects of essential oils. *Weed Science*, 50, 425-431.
192. Ultee A., Bennik M.H.J. and Moezelaar R.J.A.E.M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
193. Utama IMS., Wills RBH., Ben-Yehoshua S. and Kuek C. (2002) In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 6371-6377.
194. Vokou D., Douvli P., Blionis G.J. and Halley J.M. (2003). Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *Journal of Chemical Ecology*, 29, 2281-2301.
195. Wang L., Cui S., Liu Z., Ping Y., Qiu J. and Geng X. (2018). Inhibition of mitochondrial respiration under hypoxia and increased antioxidant activity after reoxygenation of *Tribolium castaneum*. *PloS one*, 13(6), e0199056.
196. Weir T.L., Park S.W. and Vivanco J.M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 472-479.
197. Worek F., Aurbek N., Wetherell J., Pearce P., Mann T. and Thiermann H. (2008). Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: pig versus minipig acetylcholinesterase. *Toxicology*, 244(1), 35-41.
198. Xiang X., Cao M. and Zhou Z. (2007). Fossil history and modern distribution of the genus *Abies* (Pinaceae). *Front. For. China*, 2, 355-365.

- 199.Yadav N., Yadav R. and Goyalb A. (2014). Chemistry of Terpenoids. *InternationalJournal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 27(2), 272-278.
- 200.Yadav S.K. (2022). Physiochemical Properties of Essential Oils and Applications. In *Essential Oils-Advances in Extractions and Biological Applications. IntechOpen*.
- 201.Zambonelli A., Zechini d'Aulerio A., Bianchi A. and Albasini A. (1996) Effects of essential oils on phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, 144, 491-494.
- 202.Zhang X. (2004). Cholinergic activity and amyloid precursor protein processing in aging and Alzheimer's disease. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 3 (2), 137-152.
- 203.Zi X., Zhou S. and Wu B. (2022). Alpha-Linolenic Acid Mediates Diverse drought responses in maize (*Zea mays* L.) at seedling and flowering stages. *Molecules*, 27, 771.

TheIUCNRedListofThreatenedSpecies2011:Yahi,N.,Knees,S.&Gardner,M.2011.

Abies numidica. e.T30320A9534972

doi:10.2305/IUCN.UK.20112.RLTS.T30320A9534972.en.

Matériels&Méthodes

Motivations

Dans le cadre de la conservation et de la valorisation des ressources naturelles, nous nous sommes intéressés à explorer les coproduits végétaux de deux espèces de Pinacées, actuellement confrontées à des menaces environnementales et anthropiques critiques. Les incendies, les attaques parasitaires et les problèmes de régénération, conjugués aux impacts humains tels que le surpâturage et les coupes de bois, mettent en péril ces arbres emblématiques et leurs écosystèmes. Face à cette situation, nous avons choisi d'explorer le potentiel des extractibles végétaux, en particulier les huiles essentielles, comme moyen de préservation de ces espèces menacées.

Notre recherche vise à démontrer comment l'exploitation durable des huiles essentielles peut contribuer à la protection et à la préservation de ces arbres, tout en offrant des alternatives économiques viables pour les communautés locales. En mettant en lumière les propriétés bénéfiques et les applications potentielles de ces huiles, nous espérons renforcer les stratégies de conservation de ces habitats naturels et de leurs précieuses ressources. L'approche adoptée dans notre travail consiste à établir une méthode rigoureuse pour l'extraction et l'analyse des huiles essentielles, permettant ainsi d'évaluer leur composition chimique et leurs propriétés intrinsèques.

En adoptant des techniques d'extraction respectueuses de l'environnement et en analysant minutieusement les composants actifs des huiles essentielles, nous visons à fournir une base scientifique solide pour l'utilisation de ces coproduits végétaux. Cela pourrait non seulement contribuer à la sauvegarde de ces Pinacées menacées, mais aussi ouvrir la voie à de nouvelles opportunités économiques pour les communautés dépendantes de ces forêts.

Notre section "Matériels et Méthodes" détaille les procédures expérimentales adoptées, garantissant la reproductibilité et la fiabilité des résultats obtenus.

I. Matériels&Méthodes

I.1. Matériel végétal de l'étude des huiles essentielles

Les parties aériennes (aiguilles, branches et cônes) de *Pinus nigra* et d'*Abies numidica* ont été collectées entre juin 2009 et septembre 2011 (**Tableau 3**) à un niveau de la zone intégrale de la forêt de Tigounatine du Parc National du Djurdjur pour la première espèce et à un niveau de la forêt de Djebel Tababort pour la seconde.

Tableau 3: Caractérisation des sites de récolte: Coordonnées géographiques et dates de récolte des parties végétales des espèces étudiées

Famille	Espèces	Parties utilisées	Provenance	Coordonnées géographiques	Date de récolte
Pinaceae	<i>Pinus nigra</i> ssp. <i>mauretanica</i>	Rameaux	Réserve intégrale du PND (peuplement naturel)	altitude 1521m, latitude 36°27'09"N, longitude 004°06'26"E	Juin 2009
		Feuilles (en aiguilles)			
		Cones (matures)			Juin 2011
	<i>Abies numidica</i>	Rameaux	Mont Tababort (peuplement naturel)	altitude 1420m, latitude 36°32'52.17"N, longitude 5°27'10.74"E	Septembre 2011
		Feuilles (en aiguilles)			
		Cones (matures)			

Après la collecte, dans un premier temps, les aiguilles ont été enlevées et séparées des branches. Dans un second temps, séparément, toutes les parties végétales obtenues sont mises à sécher, à l'ombre à la température ambiante, dans une chambre aérée. Coupées grossièrement pour l'opération d'extraction des HEs

I.2. Extraction des huiles essentielles

En plus de l'hydrodistillation, seuls les aiguilles et les branches de *P. nigra* ont été aussi servis pour l'extraction de composés volatiles par la SPME.

I.2.1. Extraction par hydrodistillation (HD)

Une hydrodistillation (**Figure 23**) est assurée grâce à un appareil de type Clevenger, où 300 g de matière végétale sont introduites avec une quantité suffisante d'eau distillée dans un ballon de 2 L. Après installation et fermeture du montage, la mise en marche du chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée.

La vapeur chargée d'huile essentielle arrive dans le condenseur. La durée totale de l'extraction est estimée à 3 h (jusqu'à ce qu'on obtienne plus d'HE). L'huile essentielle se distingue de l'hydrolat (eau aromatique) par sa différence de densité et de couleur. On la sépare de celui-ci par décantation. Elle est ensuite séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis récupérée et conservée dans des flacons de couleur brune, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière.

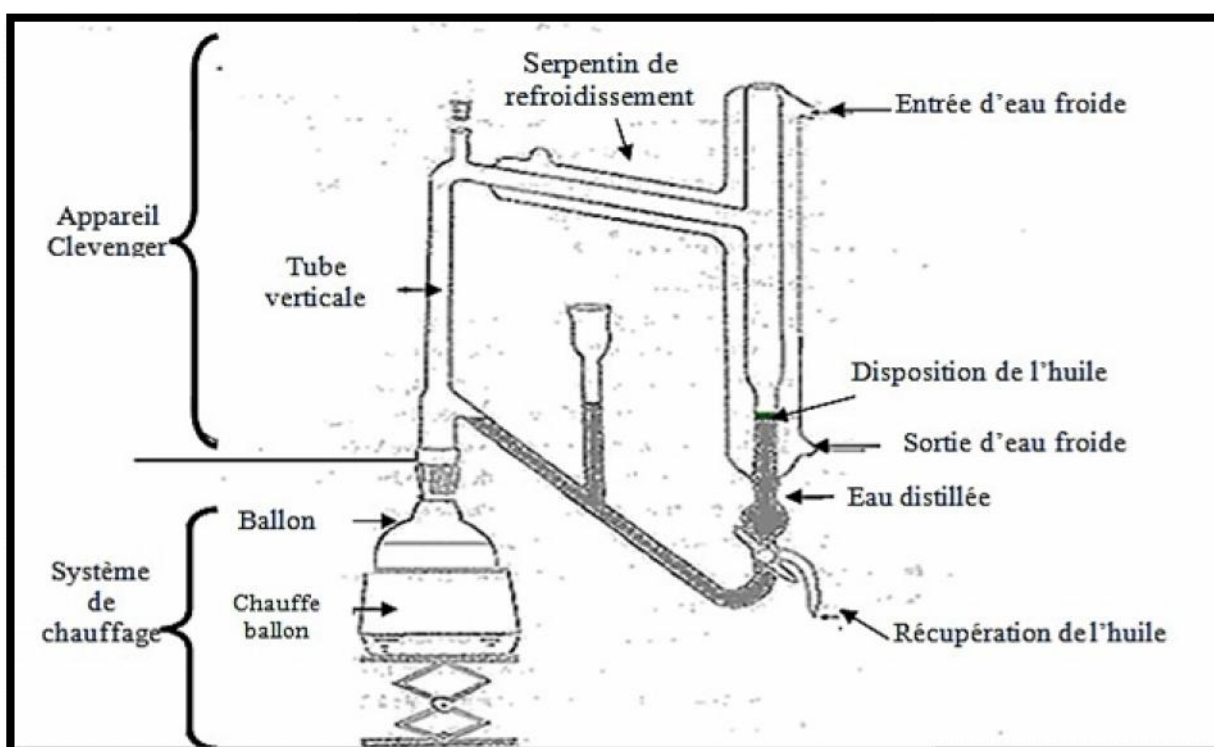


Figure 23: Dessin schématisé d'un hydrodistillateur de type Clevenger.

I.2.2. Microextraction en Phase Solide (SPME)

Les volatils émis ont été échantillonnés au moyen d'une micro-extraction en phase solide (SPME) en utilisant une fibre SPME (Supelco) recouverte de polydiméthylsiloxane (PDMS, 100 μ m). Après un temps d'équilibration (20 min), la fibre a été exposée à l'espace de tête pendant 5 secondes (temps de saturation) à 75 °C en utilisant environ 5 g de matrice végétale dans un ballon conique de 50 ml. Une fois l'échantillonnage terminé (**Figure 24**), la fibre a été retirée de l'aiguille et transférée au port d'injection du système de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse à impact électronique (GC-EIMS).

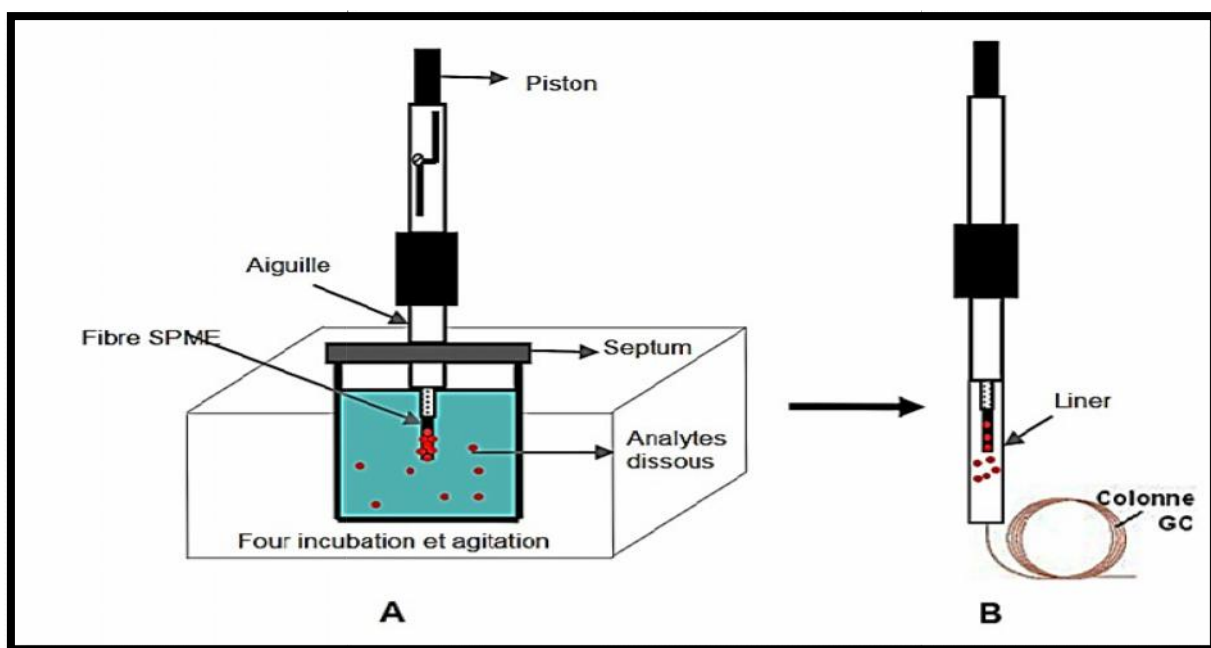


Figure 24: Représentation schématisée de la SPME. A: extraction des analytes. B: désorption thermique et analyse en GC-MS (Adapté de [Kanan, 2012](#)).

I.3. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle ($Rdt_{(HEs)}$) est le rapport entre le poids de l'huile (P_{HE}) extraite et le poids de la plante sèche (P_{plante}), utilisé pour l'extraction. Dans le cas où on utilise un matériel végétal frais, on rapporte le rendement à celui du matériel sec en tenant compte de sa teneur en eau.

Le rendement est exprimé en pourcentage (%), calculé selon la formule ci-dessous:

$$Rdt_{(HEs)} = \frac{P_{HE}}{P_{plante}} \times 100$$

I.4. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles

I.4.1. Détermination de la densité relative (AFNOR NF-T75-111)

La densité relative est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse d'un égal volume d'eau distillée à la même température. Cette grandeur est mesurée à l'aide d'un pycnomètre.

Le pycnomètre parfaitement propre et sec est pesé. Ensuite, il est rempli avec de l'eau distillée. L'ensemble est pesé et le poids est noté. La manipulation est ensuite répétée en remplaçant l'eau par l'huile essentielle.

Entre chaque mesure, le pycnomètre est rincé avec l'alcool puis séché à l'étuve. La

densité est donnée par la relation :

$$d_{20}^{20} = (m_1 - m_0) / (m_2 - m_0)$$

Où

d_{20}^{20} : densité relative à 20°C

m_0 : masse du pycnomètre vide (g)

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau (g)

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle (g)

I.4.2. Détermination de l'indice de réfraction (AFNOR NF-T75-112)

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminé passant de l'air à l'huile essentielle maintenue à une température constante. La détermination de l'indice de réfraction peut servir aux deux fins suivantes :

- Contrôler la pureté;
- Déterminer la composition d'un mélange. Si deux liquides sont miscibles, il existe une relation linéaire entre l'indice de réfraction de leur mélange et sa composition exprimée en fraction molaire.

L'échantillon est mis au contact de l'une des faces d'un prisme dont l'indice de réfraction est supérieur à celui de l'échantillon. Le tout est illuminé par un ensemble de rayons lumineux rasants la surface de contact. Une fois réfractés, ces rayons délimitent une zone claire et une zone

sombredontlalimiteaunepositionangulairequiestfonctiondel'indicederéfractiondel'huile essentielle.

L'indice de réfraction à 20°C, notée n_{td} est mesurée à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE de type à angle de réfraction. Avant de procéder à la mesure, l'appareil est d'abord étalonné avec de l'eau distillée. Pour cela, quelques gouttes d'eau sont déposées sur le prisme puis laissées pendant 5 min, le temps que sa température s'équilibre avec celle de l'appareil et du laboratoire. L'indice de réfraction est alors lu sur le réfractomètre.

Notons que la température de la salle au moment de la mesure (25°C) est notée et avant chaque mesure, il est nécessaire de vérifier qu'elle ne varie pas. Après l'étalonnage, le même procédé est répété sur l'échantillon. Trois mesures sont effectuées et c'est la moyenne des valeurs obtenues qui constituera le résultat. Entre les mesures, le prisme est essuyé avec du coton, rincé à l'éthanol et l'eau distillée puis séché avec du papier filtre.

Laformulesuivantepermetdecaculerl'indicederéfractionà20°C :

$$n_{dt}=n_{td}+0,0004(t'-t).$$

Où:

n_{dt} :indicederéfractionà20°C;

t' :températuredelasalleaumomentdelamesure(°C);

t :températurederéférence(20°C);

n_{td} :valeurdel'indicederéfractionmesuréeàlatempératuret'.

Il est à noter que l'indice de réfraction des huiles essentielles varie de 0,0004 par degré autour de 20°C.

I.4.3. Indiced'acide

L'indice d'acide, noté I_a , indique la quantité d'acides libres dans une huile. Il est défini comme la masse d'hydroxyde de potassium, exprimée en mg, nécessaire pour neutraliser les acides libres dans 1,0 g d'huile essentielle selon la réaction :



Le calcul de l'indice d'acide I_a est calculé à partir de la relation suivante :

$$I_a = \frac{56.1 \times V \times N_{KOH}}{m}$$

Où:

V : volume en ml de KOH nécessaire pour le titrage de l'huile essentielle;

N_{KOH} : normalité d'hydroxyde de potassium KOH soit 0,05N;

m : masse en gramme de l'huile essentielle de l'eucalyptus à titrer soit 1g

1.4.4. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde I_p est le nombre qui exprime, en milliéquivalents d'oxygène actif, la quantité de peroxyde contenue, dans 1000 g de substance selon la méthode décrite ci-après :

La prise d'essai m en (g) d'HE est dissoute dans le chloroforme en présence d'acide acétique. On ajoute successivement de l'iodure de potassium et l'eau. L'iode obtenu par oxydation est dosé par une solution titrée de thiosulfate de sodium 0.01 M (n_1 ml versé) en présence d'empois d'amidon. Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions (sans HE).

La formule ci-après permet de calculer l' I_p :

$$I_p = \frac{(n_1 - n_2)}{100 \times m} \times 1000$$

1.5. Analyse des huiles essentielles

Notons ici que les analyses des HEs d'*A. numidica* et cônes de *P. nigra* ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem doté de deux injecteurs automatiques et de deux colonnes capillaires (50 m x 0,22 mm d.i.; épaisseur du film: 0,25 µm), polaire (BP-20, polyéthylène glycol) et apolaire (BP-1, diméthylpolysiloxane) et couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass (Clarus SQ8S). Préalablement, ces huiles ont été analysées par ^{13}C -RMN sans séparation. En revanche, les huiles des aiguilles et des branches de *P. nigra* ont été analysées par un chromatographe en phase gazeuse Varian CP-3800 équipé d'une colonne capillaire DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 mm d'épaisseur de revêtement) et d'un détecteur de masse à piège à ions Varian Saturn 2000.

Dans les paragraphes qui suivent nous décrivons les outils utilisés dans la séparation et l'identification des molécules contenues dans les différentes HEs extraites.

I.5.1. Cas des HEs *A. numidica* et cônes de *P. nigra*

I.5.1.1. Chromatographie en phase gazeuse-détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)

Les analyses GC ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse Clarus 500 de Perkin Elmer équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et de 2 colonnes capillaires en gel de silice fondu : BP-1 (polydiméthylsiloxane, 50 m x 0,22 mm i.d., épaisseur du film : 0,25 µm) et BP-20 (polyéthylène glycol, 50 m x 0,22 mm i.d.). La température du four a été programmée de 60 à 220 °C à une vitesse de 2 °C/min, puis maintenue isotherme pendant 20 minutes à 220 °C, avec une température d'injecteur de 250 °C, une température de détecteur de 250 °C, un gaz vecteur : l'hydrogène (0,8 ml/min), et un rapport de division de 1/60. Les proportions relatives des constituants de l'huile ont été exprimées en pourcentages obtenus par normalisation de la surface des pics, sans utiliser de facteurs de correction. Les IR ont été déterminés par rapport aux temps de rétention d'une série de n-alcanes avec interpolation linéaire (logiciel "Target Compounds", Perkin Elmer).

I.5.1.2. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS)

Les HEs ont été analysés à l'aide d'un détecteur TurboMass (quadripôle) de Perkin Elmer, directement couplé à un Autosystem XL de Perkin Elmer, équipé d'une colonne capillaire en gel de silice fondu (BP-1 polydiméthylsiloxane, 50 m, 0,22 mm i.d., épaisseur du film 0,25 µm). Gaz vecteur : hélium (à 1,0 ml/min) ; rapport de division, 1/80 ; volume d'injection, 0,2 µl ; température de l'injecteur, 250 °C ; température du four programmée de 60 à 230 °C à une vitesse de 2 °C/min, puis maintenue isotherme pendant 20 minutes à 220 °C ; température de la source d'ions de 250 °C ; énergie d'ionisation de 70 eV.

I.5.1.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres ¹³C-RMN ont été enregistrés sur un spectromètre à transformée de Fourier Bruker AVANCE 400 fonctionnant à 100,63 MHz pour le ¹³C, équipé d'une sonde de 5 mm, dans le CDCl₃, tous les déplacements étant référencés par rapport à l'étalon interne TMS. Les paramètres suivants ont été utilisés : largeur d'impulsion = 4 µs (angle de bascule 45°) ; temps d'acquisition = 2,7 s pour une table de données de 128 K avec une largeur spectrale de 25000 Hz (250 ppm) ; découplage en mode CPD ; résolution numérique = 0,183 Hz/pt. Le nombre de scans accumulés était de 3000 pour chaque échantillon (40 mg d'huile essentielle dans 0,5 mL de CDCl₃).

I.5.1.4. Identification des composants individuels

L'identification des différents composants a été réalisée par : (i) comparaison de leurs indices de rétention GC (RI) sur des colonnes polaires et non polaires avec ceux de composés de référence compilés dans une bibliothèque construite en laboratoire et avec des données de la littérature (Konig et al., 2001) ; ii) comparaison par ordinateur avec des bibliothèques commerciales de spectres de masse (NIST, 1999; König et al., 2001; Adams, 2007) ; iii) comparaison des signaux dans les spectres ^{13}C -RMN des échantillons avec ceux des spectres de référence compilés dans la bibliothèque spectrale du laboratoire, à l'aide d'un logiciel construit en laboratoire (Tomi et al., 1995 ; Tomi & Casanova, 2006 ; Bazzali et al., 2016).

I.5.2. Cas des HES des aiguilles et des branches de *P. nigra*

I.5.2.1. Analyse HS-SPME

Les volatiles émis ont été échantillonnés par micro-extraction en phase solide (SPME) à l'aide d'une fibre SPME (Supelco) recouverte de polydiméthylsiloxane (PDMS, 100 μm). Après un temps d'équilibrage (20 min), la fibre a été exposée à l'espace de tête pendant 5 secondes (temps de saturation) à 75°C en utilisant environ 5 g de matrice végétale dans un ballon conique de 50 mL. Une fois l'échantillonnage terminé, la fibre a été retirée de l'aiguille et transférée au port d'injection du système de chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse à impact électronique (GC-EIMS).

I.5.2.2. Analyse GC-EIMS

Les analyses GC-EIMS ont été réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse Varian CP-3800 équipé d'une colonne capillaire DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm d'épaisseur de revêtement) et d'un détecteur de masse à piège à ions Varian Saturn 2000. Les analyses GC-EIMS ont été effectuées dans les conditions suivantes pour tous les étalons : température de l'injecteur 220°C ; ligne de transfert 240°C ; plage de température du four 60-240 (3°C/min) ; gaz vecteur hélium à 1 ml/min ; injection de 0,2 ml (solution de n-hexane à 10 %) et split ratio 1:30 ; spectres de masse dans la plage 35-400 m/z (1 scan/s). L'identification des composés chimiques a été basée sur la comparaison des valeurs des temps de rétention avec celles d'étalons authentiques, ou en comparant leurs indices de rétention linéaires par rapport à la série homologuée des alcanes ; composés chimiques rassemblés par Adams (Adams, 1995) ; données des bibliothèques MS (NIST 98) ; spectres de masse de la bibliothèque interne construits à partir de substances pures Swigar & Silverstein, (1981) ou données rapportées dans la

littérature (Stenhagen *et al.*, 1974 ; Jennings & Shibamoto, 1980 ; Davies, 1990 ; Adams, 1995).

II. Activitébiologiques

II.1. Évaluationdel'activitéantioxydantedeshuiles essentielles

II.1.1. ActivitéscavengerduradicalDPPH•

Ce test mesure l'activité de piégeage du radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène dans les échantillons d'huile.

Brièvement, 20 ml de chaque dilution d'HE (1-100 mg/mL) ou de standards (α -tocophérol et composés purs d'HE utilisés comme contrôles positifs) ont été ajoutés à 180 μ L de solution éthanolique de 100 mM DPPH dans une microplaque à 96 puits.

Le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min et l'absorbance a été mesurée à 515 nm par rapport au blanc d'éthanol (Rangkadilok *et al.*, 2007).

Le pourcentage de capacité d'inhibition du radical libre DPPH a été calculé à partir de la formule ci-dessous :

$$\% \text{d'inhibition} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Où:

$A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de la réaction du contrôle (contenant la solution de DPPH et l'éthanol) et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance en présence de l'extrait végétal (HE et standards).

Les résultats ont été exprimés par la CI_{50} , qui représente la concentration requise pour piéger 50 % du DPPH, calculée à partir du graphique représentant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations d'HE.

II.1.2. ActivitédepiégeageduradicalABTS^{•+}

Le radical cationique ABTS (couleur bleu-vert) est formé par la perte d'un électron par l'atome d'azote. En présence d'un antioxydant, l'atome d'azote neutralise l'atome d'hydrogène et donc la solution se décolore (Pisoschi & Negulescu, 2011). L'ABTS a été généré en faisant réagir à température ambiante pendant 16 heures à l'obscurité, 7 mM de sel ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) (Katalinic *et al.*, 2006). Le cation radical a été dilué avec de l'éthanol jusqu'à une valeur d'absorbance de $0,750 \pm 0,025$ à 734 nm. À 20 mL de diverses concentrations (1-100 mg/mL) d'HE et de standards, 180 μ L de solution ABTS ont

été ajoutés. L'absorbance a été mesurée 6 min après l'incubation à l'obscurité et à température ambiante, contre un blanc d'éthanol. Le témoin contenant une solution d'ABTS et de l'éthanol a été préparé dans les mêmes conditions.

L'effet de piégeage a été calculé par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Où : $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance du contrôle et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance des HEs ou des standards.

Les résultats sont exprimés par la CI_{50} , qui représente la concentration requise pour piéger 50 % de l'ABTS, calculée de la même manière que celle décrite pour le test du radical DPPH.

II.1.3. Essai de blanchissement de β -carotène

Ce test est basé sur l'oxydation du β -carotène par des radicaux libres, principalement des diènes conjugués provenant d'hydroperoxydes issus de l'oxydation de l'acide linoléique (Ghazian et al., 2016). L'émulsion a été préparée en mélangeant 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 20 dans 3 ml de solution de β -carotène (5 mg/ 50 ml de chloroforme). Le chloroforme a été complètement évaporé et 100 mL d'eau distillée oxygénée ont été ajoutés au mélange sec et agité de façon vigoureuse. À 100 ml d'He ou d' α -tocophérol (1-5 mg/mL), on a ajouté 3 ml de l'émulsion fraîche obtenue. L'absorbance à 470 et 700 nm a été lue immédiatement et après 60 min d'incubation à 50 °C (Lim & Quah, 2007). Le contrôle (contenant tous les réactifs sans l'échantillon testé) a été préparé dans les mêmes conditions. Le taux de dégradation du β -carotène (DR) a été calculé par la formule suivante :

$$DR = A_{0 \text{ min}} - A_{60 \text{ min}}$$

Où :

$A_{0 \text{ min}}$ est l'absorbance initiale au temps 0 minutes et $A_{60 \text{ min}}$ est l'absorbance à 60 minutes.

L'activité antioxydante (%AA) a été calculée par la formule suivante :

$$AA \% = \frac{DR_{\text{contrôle}} - DR_{\text{échantillon}}}{DR_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Les résultats sont exprimés par la CI_{50} , qui représente la concentration nécessaire pour obtenir 50 % du taux de dégradation du β -carotène.

II.1.4. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

Dans cette méthode, le principe est que l'antioxydant (HEs dans nos expérimentations) réagit avec le ferricyanure de potassium pour former du ferrocyanure de potassium qui réagit ensuite avec le trichlorure de fer pour donner un complexe de couleur bleue avec une absorbance maximale à 700 nm (Pisoschi & Negulescu, 2011).

1 mL d'HE ou d' α -tocophérol a été mélangé à un tampon de phosphate de sodium (2,5 mL, 0,2 M, pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution à 1 % de $K_3Fe(CN)_6$. Après une incubation à 50 °C pendant 20 min, 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10 % ont été ajoutés au mélange et centrifugés à 3000 g pendant 10 min. 2,5 mL de surnageant ont été mélangés avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de $FeCl_3$ à 0,1 %. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance du mélange indique une augmentation du pouvoir réducteur (Liu & Yao, 2007).

II.1.5. Activité antioxydante totale (Test au phosphomolybdène)

L'évaluation de l'activité antioxydante totale des HEs a été évaluée par la méthode du phosphomolybdène qui est basée sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) (Prieto et al., 1999). 400 μ L d'HE ont été ajoutés à 4 mL de solution réactive (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdène d'ammonium 4 mM). Le mélange réactionnel a été incubé à 95 °C pendant 90 minutes. L'absorbance de la solution a été mesurée à 695 nm par rapport à un blanc (400 mL d'éthanol et 4 mL de la solution de réactif). La capacité antioxydante a été exprimée en équivalent d'acide ascorbique ($mg\ AAE\ g^{-1}$ d'HE).

II.2. Évaluation de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase / butyrylcholinestérase

Les mesures de l'activité inhibitrice de l'AChE/BChE ont été effectuées par le test d'Ellman légèrement modifié. Un mélange contenant 180 μ L de tampon phosphate (0,1 M, pH 8), 10 μ L de DTNB (à une concentration finale de 0,3 mM préparé dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7 avec du bicarbonate de sodium 0,12 M ajouté pour la stabilité), 10 μ L de la solution d'échantillon (dissout dans 80 % d'EtOH), et 10 μ L de la solution d'AChE/BChE (avec une concentration finale de 0,03 U/mL). Les réactifs ont été mélangés dans les puits d'une plaque à 96 puits et la réaction a été initiée par l'ajout de 10 μ L d'iodure d'acétylthiocholine/butyrylthiocholine iodide (ATChI/BTChI, pour atteindre une concentration finale de 0,5 mM). Comme contrôle négatif, 80 % d'EtOH a été utilisé à la place de la solution d'échantillon. L'hydrolyse non enzymatique a également été contrôlée par la mesure de deux blancs pour chaque série. En bref : dans le premier blanc, l'AChE/BChE, respectivement, a été remplacé par une quantité équivalente de

tampon et dans le second blanc, l'ATChI/BTChI, respectivement, a été remplacé par une quantité équivalente de tampon.

Toutes les mesures spectrophotométriques ont été effectuées à 405 nm et à température ambiante pendant des périodes de 6 minutes en utilisant le lecteur de microplaques multimodes Synergy HTX S1LFA (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique ou IC₅₀ - dans la mesure du possible et par rapport à la norme (tacrine) (Burčul, 2018).

II.3. Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Trois souches de bactéries phytopathogènes nous ont été fournies par le docteur Ladjouzi Rachid, chercheur au laboratoire de recherche en Microbiologie Appliquée de l'université de Bejaia. Il s'agit de :

Dickeya dadantii (3937), issue de l'UMR Microorganismes, Adaptation et Pathogénie (MAP) - Université Claude Bernard, Lyon-France ;

Dickeya solani (99), provenant du Laboratoire de Protection végétale de Biotechnologie - Université de Gdansk, Pologne ;

Pectobacterium carotovorum sp. *carotovorum* (88.22) issue de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP)-INRA de Rennes, France.

II.3.1. Préparation des précultures

Une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 McFarland (10^8 UFC/ml) est préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Cet inoculum sert à ensemencer l'agelose Mueller Hinton coulé dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm, les boîtes sont ensuite séchées à l'étuve à 37 °C avant emploi.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage (Rahal, 2005), il consiste à tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer à l'intérieur du tube puis le frotter à trois reprises sur toute la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution homogène de l'inoculum. Pour chaque souche testée, 8 boîtes de Pétri sont écouvillonnées, (2 boîtes pour chaque dilution plus 2 boîtes pour les témoins positif et négatif).

II.3.2. Méthode de diffusion

L'étude de l'activité antibactérienne est réalisée par le test de diffusion sur Agar. Des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre ont été préparés, stérilisés puis déposés à la surface des boîtes ensemencées. 5 µl d'huile essentielle diluée dans du DMSO à 1/2, 1/5 et 1/10 (v/v) sont déposés à la surface des disques.

Des disques d'antibiotiques (Gentamycine (10 UI)) sont utilisés comme témoins positifs et 5 µl de DMSO sont disposés sur les disques comme témoins négatifs. Les boîtes sont mises à 4 °C pendant une heure pour permettre une bonne diffusion de l'huile.

Afin de garantir des résultats reproductibles, chaque trois dépôts d'huile essentielle de concentration similaires ont été placés dans la même boîte. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré.

II.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les huiles essentielles à tester sont dissoutes dans des micro-tubes stériles contenant du DMSO. Des séries de dilutions de 1/2 sont faites dans des microplaques de 96 puits. 50 µl de chaque dilution sont transférés dans les puits de la microplaque, qui contiennent chacun 150 µl de bouillon nutritif (BN) inoculé avec 10⁶ UFC/ml de cultures jeunes de bactéries.

La dernière ligne contenant seulement les dilutions en séries de l'échantillon sans microorganismes est utilisée comme témoin négatif. De l'eau distillée stérile et du milieu ensemencé servent de témoins positifs. Après 18 heures d'incubation à 37 °C, la CMI de l'huile essentielle est déterminée à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne (Bassole *et al.*, 2003).

II.4. Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles

II.4.1. Identification et conservation des souches fongiques

Trois (03) isolats de champignons (**Figure 25**) ont été fournis par l'équipe «Biomasse» du laboratoire de recherche en énergie renouvelable de l'Université de Bejaia. Il s'agit d'espèces pathogènes aux céréales et à la culture de la tomate. Pour l'identification morphologique, tous les champignons ont été repiqués sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et milieu CLA (Carnation Leaf Agar). Les caractéristiques macroscopiques des colonies (couleur, croissance, aspect du mycélium) sont observées sur le milieu PDA, alors que les caractéristiques microscopiques des spores (taille, forme, formation, etc.) sont observées à partir des spores prélevées sur des cultures sur CLA. La conservation de longue durée des

souches de champignons a été effectuée à une température de -20°C dans des tubes Eppendorf stérilisés, contenant chacun 1 mL de glycérol 30% (30 mL de glycérol et 70 mL d'eau distillée).



Figure 25: Aspects morphologiques des espèces fongiques étudiées

II.4.2. Mode opératoire de l'essai de l'activité antifongique

Les huiles essentielles ont été d'abord diluées dans 1 mL d'une solution de tween 20 à 0,1% (0,1 mL de tween dans 100 mL d'eau distillé) préalablement autoclavées, à concentration unique de 4 µL/mL. Ensuite la concentration préparée a été ajoutée à 20 mL de PDA autoclavée et refroidi à 50°C. Puis le mélange a été versé dans une boîte de Pétri. La solution de tween a pour rôle de rendre les huiles essentielles solubles dans le milieu PDA. Ces tests antifongiques ont été réalisés par repiquage au centre de chaque boîte de Pétri d'un disque de mycélium de 5 mm de diamètre, prélevés sur l'extrémité des colonies de chaque champignon cultivés sur le milieu PDA. L'incubation a été faite pendant 7 jours à une température de 25°C à l'obscurité. Pour chaque concentration de chacune des huiles essentielles et pour chaque champignon, trois répétitions ont été effectuées (Grover et Moore, 1962 ; Cakir et al. 2004).

L'efficacité de chaque huile essentielle a été déterminée à partir du taux d'inhibition calculé par rapport au diamètre moyen des témoins (les témoins consistent en des colonies en croissance sur des milieux ne contenant pas d'huile essentielle) en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \frac{T-E}{T} \times 100$$

Où:

T: valeur moyenne de croissance radiale chez les traitements témoins. E :

valeur moyenne de croissance radiale chez les traitements essais. T-E

: zone d'inhibition (exprimée en millimètre).

II.5. Évaluation de l'activité insecticide des huiles essentielles

II.5.1. Elevage de masses d'insectes

Callosobruchus maculatus (F.) a été collecté sur une variété cultivée de niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) dans des greniers de stockage chez des paysans dans certaines localités de Bejaia. Les coléoptères du niébé ont été élevés au laboratoire sur des graines de niébé saines dans une étuve (**Figure 26**) réglée à 30 ± 1 °C, une photopériode (modification technique par ajout d'une lampe) de 12 h et une humidité relative de 75 % (installation d'un hygromètre à l'intérieure de l'enceinte). Des essais biologiques ont été réalisés sur des adultes non sexués.



Figure 26: Elevage de masses de bruches au laboratoire (étuve réglée à 30°C).

II.5.2. Conduite des essais de toxicité des HEs au laboratoire

Trois essais complémentaires sur l'efficacité insecticide des HEs dans la lutte contre les ravageurs de denrées stockées ont été conduits dans des conditions de laboratoire. Il s'agit de la toxicité par contact sur graines, de la fumigation (inhalation) et de la répulsion.

II.5.2.1. Toxicité de contact

Ce bioessai (**Figure 27**) a été réalisé selon la méthode décrite par [Tapondjou et al., \(2003\)](#) en utilisant des groupes de vingt insectes adultes pour évaluer l'effet des HEs sur la mortalité des bruches. Une quantité appropriée d'HE a été diluée dans de l'acétone pour obtenir chaque solution d'essai. Une aliquote de 1 ml de la solution test contenant 2, 4, 8, 16 et 0 (contrôle) ml/mL a été versée sur une boîte de Pétri (9 cm de diamètre) contenant 40 g de graines de niébé stérilisées (passage à 60 °C pendant 2 heures). Les boîtes de Pétri traitées ont été maintenues dans un incubateur à 30 ± 1 °C et 75 % H_r (humidité relative). Le taux de mortalité a été vérifié quotidiennement pendant 4 jours. 4 répétitions ont été mises en place pour chaque concentration.

d'HE et pour le contrôle. L'activité insecticide de l'huile a été exprimée en pourcentage de mortalité moyenne.

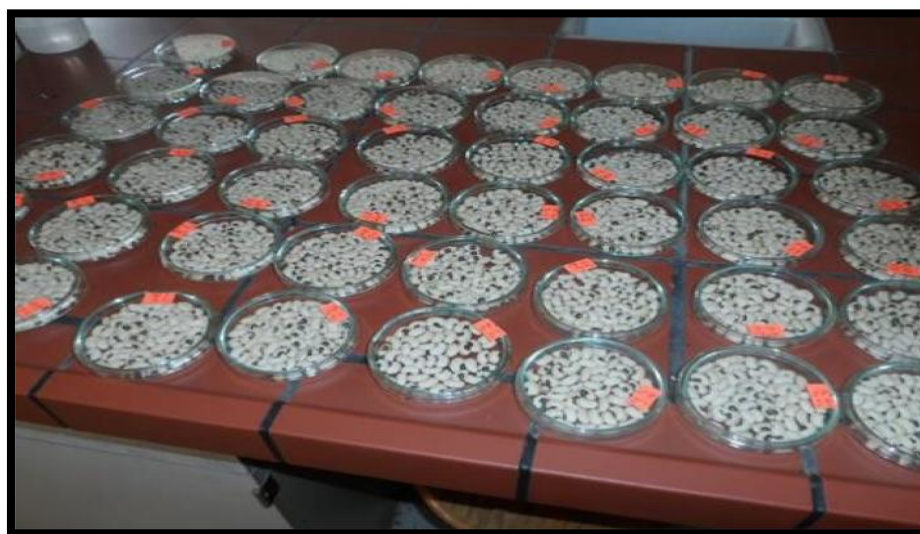


Figure 27: Photographie du dispositif expérimental de la toxicité par effet contact des HE sur grains de niébé.

II.5.2.2. Test d'inhalation

Afin de tester la toxicité des HE sur les adultes de *C. maculatus*, 20 adultes ont été placés dans des bocaux en verre (**Figure 28**) de 200 mL. Les HE ont été appliquées sur un morceau de coton fixé sur la face inférieure du couvercle du bocal (**Toudert-Taleb et al., 2014**). Les doses d'HE utilisées étaient de 2, 4, 8, 16 et 0 (contrôle) mL/mL. Les bocaux en verre ont été maintenus à 30 ± 1 °C et 75% Hr. Les comptages de mortalité ont été effectués à 24, 48, 72 et 96 h après le traitement. Quatre répétitions ont été utilisées pour chaque dose.



Figure 28: Photographie du dispositif expérimental de la toxicité des HE par fumigation.

II.5.2.3. Testderépulsionsurpapier filtre

Le pouvoir répulsif a été testé à l'aide du test de préférence de surface (**Figure 29**) décrit par (**McDonald et al., 1970**). La méthode a été adaptée comme suit : Des disques de papier filtre(WhatmanN°1,11cmdediamètre)ontétécoupésendeuxpartieségales.Unemoitiéde disquaététraitéeuniformémentavecdesaliquotesde0,5mldesolutionsd'HEsdansl'acétone à des doses de 2, 4, 8 et 16 ml/mL. La seconde moitié du papier-filtre a été traitée avec de l'acétone comme contrôle et tous les demi-disques ont été séchés à l'air pendant 15 minutes. Vingtadultesnonsexuésde*C.maculatus*ontétéintroduitsaumilieudechaqueboîtedePétri, qui a été scellée avec du parafilm. Quatre répétitions ont été effectuées pour chacune des concentrations testées. Après 1 heure, les bruches présentes sur les deux demi-filtres ont été comptés. Les valeurs de répulsion en pourcentage (PR) ont été calculées comme suit :

$$PR(\%) = \frac{N_c - N_t}{N_c + N_t} \times 100$$

Où:

N_c est le nombre d'insectes sur le demi-papier filtre du contrôle négatif (avec 0,5 mL d'acétone) et N_t est celui du demi-papier traité à l'opposé (avec 0,5 mL des solutions d'HE dans de l'acétone). La valeur de répulsion moyenne a été calculée et attribuée à des classes de répulsion de 0 à V selon (**McDonald et al., 1970**) : classe 0 (PR = 0,1%), classe I (PR = 0,1- 20%), classe II (PR= 20,1- 40%), classe III (PR = 40,1- 60%), classe IV (PR = 60,1- 80%) et classe V (PR = 80,1-100 %).

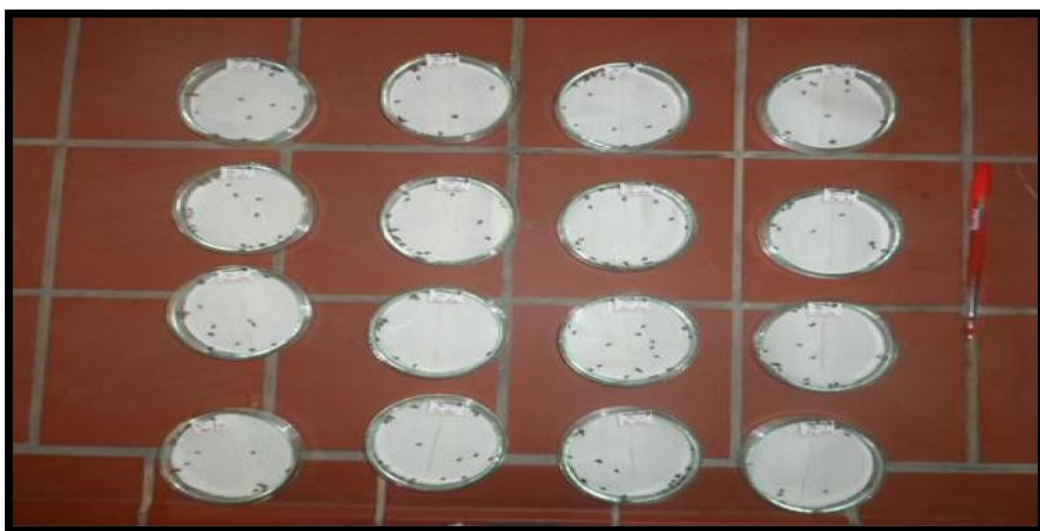


Figure 29: Photographie du test de préférence de surface utilisé dans l'effet répulsif des HEs.

II.5.3. Calcul des descripteurs numériques de toxicité

La performance d'un agent biocide est mesurée par le taux de mortalité qu'il induit chez l'espèce ciblée. Toutefois, le dénombrement des organismes morts après un traitement biocide ne reflète pas nécessairement le nombre exact d'individus morts par le produit en question. En effet, au sein de toute population exposée, une certaine mortalité naturelle s'ajoute à celle provoquée par l'agent toxique. Afin de distinguer ces deux types de mortalité et d'obtenir un pourcentage précis de l'efficacité du biocide, il est nécessaire d'appliquer la correction de la mortalité selon la formule d'Abott ci-après :

$$M_c (\%) = \frac{M - M_t}{100 - M_t} \times 100$$

Où:

M_c (%): Pourcentage de mortalité corrigée ;

M (%): Pourcentage des morts dans la population traitée et,

M_t (%): Pourcentage des morts dans la population témoin.

Les données obtenues à partir des bioessais dose-réponse (contact et fumigation) ont été analysées par le programme probit de l'USEPA, version 1.5, afin d'estimer les valeurs de DL_{50} , DL_{95} et TL_{50} des HEs.

II.6. Évaluation de l'activité herbicide des huiles essentielles

Dans le but d'étudier l'activité herbicide des huiles essentielles testées, nous avons utilisés 4 plantes qui sont réparties comme suit (**Figure 30**):

- 02 monocotylédones: *Phalaris canariensis* (Adventice et cultivé; famille botanique: Poacées) et *Triticum durum* (cultivé ; famille botanique : Poacées).
- 02 dicotylédones: *Sinapis arvensis* (Adventice; famille botanique: Brassicacées) et *Raphanus sativus* (semence cultivée; famille botanique: Brassicacées).

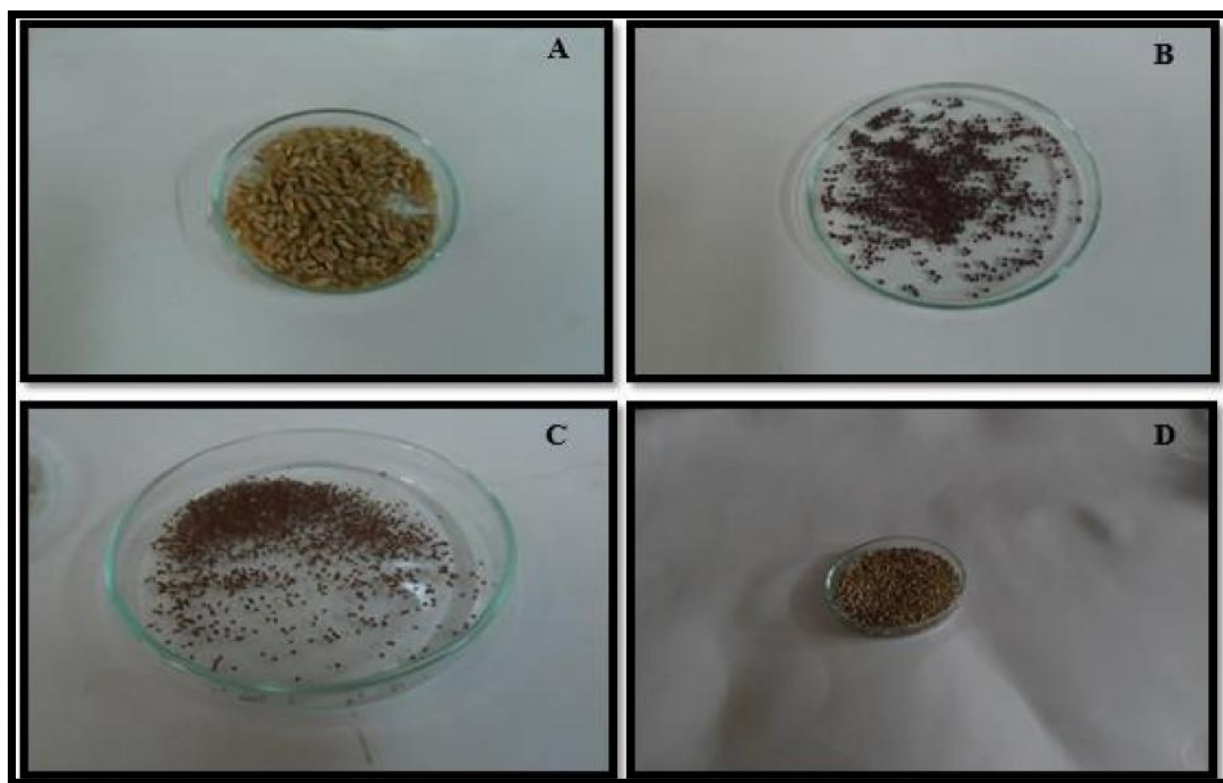


Figure 30: Photographies des graines des adventices herbacées cultivées (A: *Triticum durum*, B : *Raphanus sativus*, C : *Sinapis arvensis*, D : *Phalaris canariensis*)

II.6.1. Conduite des essais de phytotoxicité

Deux stades de développement des plantes ont été expérimentés:

II.6.1.1. Stade germinatif

L'activité herbicide des huiles essentielles a été étudiée au stade germinatif. Ceci est réalisé par la méthode de contact direct ([Tworkoski, 2002](#)). Dans des boîtes de Pétri, 10 graines sont mises à germination entre deux papiers filtres en présence de 8 ml de solution d'huile essentielle diluée dans l'eau avec le tween. Chaque essai a été répété trois fois, avec différentes concentrations d'huile essentielle. L'inhibition de la germination a été déterminée en se référant au témoin dépourvu d'huile essentielle.

Le taux de germination est calculé en se référant à la formule suivante:

$$\text{Taux de germination (\%)} = \frac{\text{Nombre de graines germées par boîte}}{\text{Nombre total de graines mises à germer dans la boîte}}$$

II.6.1.2. Stade adulte

L'étude de la phytotoxicité des HEs au stade adulte se fait par pulvérisation avec différentes concentrations de l'essence diluée dans l'eau avec le Tween. Ainsi, les résultats sont obtenus en se référant à un groupe témoin n'ayant reçu que de l'eau. Pour cela, quelques herbes ont été cultivées dans des pots remplis d'un mélange de sol, sable et terreux. Après quatre semaines de l'émergence des graines semées, la pulvérisation est effectuée. Cinq jours après la pulvérisation, les effets phytotoxiques de chaque huile essentielle à différentes doses ont été évalués par des paramètres du stress oxydatif tels l'intégrité membranaire, la peroxydation lipidique, production des espèces réactives à l'oxygène, la proline, la perte en eau et la dégradation et/ou l'arrêt de la synthèse chlorophyllienne.

II.6.1.2.1 Intégrité membranaire

Selon [Singh et al., \(2003\)](#), ce paramètre donne plus d'informations sur la stabilité de la membrane et la teneur relative en ions. Les feuilles des herbes cultivées ont été lavées avec de l'eau distillée et ont été placées dans des flacons fermés contenant 100 mL d'eau distillée et incubées à 25°C pendant 2 heures. La conductivité électrique de la solution (C_1) a été mesurée à l'aide d'un conductimètre électrique. Cette mesure permet de détecter les fuites d'ions causées par le traitement de l'HE par rapport aux ions totaux normalement présents dans l'échantillon. Les échantillons ont été passés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes et la conductivité électrique (C_2) obtenue après stabilisation à 25° C. Cette mesure révèle le maximum de fuites d'ions.

La fuite d'électrolytes est déterminée par la formule suivante:

$$\text{Intégrité membranaire (\%)} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

II.6.1.2.2 Peroxydation des lipides

La peroxydation des lipides est un mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras membranaires conduisant à la formation d'hydroperoxydes (ROOH) instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire en altérant son fonctionnement. Elle est estimée par l'évolution de la teneur en malondialdéhyde (MDA), produit de la dégradation oxydative des lipides et des acides gras insaturés, qui est déterminée selon la méthode décrite par [Prasad et al., \(1995\)](#).

Le mode opératoire consiste à broyer 100 mg du matériel végétal (feuilles des plantes), et le diluer dans 4mL d'acide trichloracétique TCA (20 %). Cette procédure sert à assurer la libération des radicaux libres présents dans l'échantillon. Ainsi, le réactif choisi permettra la précipitation des radicaux libérés. Le niveau du MDA servira comme indice de peroxydation lipidique, et le résultat sera donc exprimé en nmol /g de MDA. Ensuite, prélever 2 mL de l'extrait qui sera centrifugé à une vitesse de 10000 tr/min pendant 10 minutes à 4°C. Puis, ajouter à 1ml du surnageant 4ml de l'acide thiobarbiturique TBA 0.5 % (ce réactif réagit avec le MDA). Le mélange est finalement incubé à 95°C pendant 30 minutes suivi d'un refroidissement rapide sur la glace. L'absorbance du surnageant sera lue à 532nm, et la teneur en MDA est calculée par la formule suivante $DO = \epsilon.C.l$ (Loi de Beer Lambert) en utilisant le coefficient d'extinction molaire du MDA ($\epsilon = 155 \text{ l. mmol}^{-1}. \text{cm}^{-1}$)

II.6.1.2.3 Production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

H_2O_2 est produit pendant le stress oxydatif. Sa teneur dans les feuilles traitées a été déterminée selon le protocole décrit par [Lins et al., \(1996\)](#). Les feuilles traitées ont été ramassées après 5 jours, extraites avec de l'acide trichloracétique (TCA, 5 ml, 0,1%) dans un bain de glace, et l'homogénat a été centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes. 0,5 ml de surnageant a ensuite été mélangé avec 0,5 mL de tampon phosphate (pH7) et 1 mL d'iodure de potassium (1 M). L'absorbance de ce mélange réactionnel a été mesurée à 390 nm. La teneur en H_2O_2 a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 0,28 \text{ } \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et exprimée en nmol g^{-1} .

II.6.1.2.4 Teneur en proline

La teneur en proline a été déterminée selon la méthode de [Bates et al. \(1973\)](#).

100 mg de matériel végétal broyé ont été digérés dans 3 mL d'acide sulfosalicylique (3%), pendant 30 minutes à 100 °C. Ensuite, une centrifugation à 2000 tr/min a été faite pendant 5 minutes à 25 °C. L'addition de l'acide sulfosalicylique assure l'hydrolyse totale de toutes les fractions de la feuille. Puis, 0,2 mL de l'extrait a été ajouté à 0,4 mL d'eau distillée et 2 mL d'un mélange de réactifs composé de 30 mL d'acide acétique glacial, 20 mL d'eau distillée et 0,5 g de ninhydrine (révélateur des acides aminés). Ce mélange a pour but d'attaquer les acides aminés susceptibles d'être présents, et de révéler ainsi, la présence de proline. Les échantillons ont été bouillis pendant 1 heure, refroidis et extraits avec 6 ml de toluène.

L'absorbance de la phase de toluène se fait à 520 nm et la teneur en proline est calculée à partir d'une courbe standard et exprimée en μg de proline/g MS.

II.6.1.2.5 Synthèse chlorophyllienne (dosage de la chlorophylle totale)

50 mg prélevés des feuilles de différents traitements, sont broyées dans de l'acétone à 80%.

L'extrait obtenu est centrifugé à 2500 g pendant 5 min. La DO (densité optique) de la totalité du surnageant obtenus est mesurée à 646,8 nm et à 663,2 nm. Les concentrations en chlorophylles totales exprimées en mg. g⁻¹ MF (matière fraîche) sont données par la formule suivante :

$$[Chl_{tot}] = \frac{(7.15 \times DO_{663.2} + 18.71 \times DO_{646.8}) \times V}{M}$$

Où

V: Désigne le volume de l'extrait total en litres et **M** la masse de la matière fraîche broyée en grammes.

II.6.1.2.6 Teneur en eau

La teneur en eau (TE) est déterminée pour les feuilles des mauvaises herbes après pulvérisation des parties aériennes par les différentes concentrations d'huiles essentielles. Ce paramètre est exprimé en fonction du poids frais (PF) et du poids sec (PS). Le poids sec est déterminé après séchage des feuilles à 70 °C pendant 72 heures. Ensuite, la TE est calculée à partir de l'équation de la formule suivante :

$$TE(\%) = \frac{(PF - PS)}{PF} \times 100$$

II.7. Analyse statistique des données

L'ensemble des résultats obtenus lors des expériences menées a été soumis à un examen statistique d'analyse de variance (ANOVA) couvrant des modèles à un, deux et trois facteurs. Les comparaisons des moyennes ont été effectuées en utilisant la technique de la plus petite différence significative (LSD). Ces analyses ont été réalisées à l'aide de logiciels statistiques, notamment les versions XLstat 2016 (17.06), XLstat 2022 (4.1), SPSS (version 27) et Minitab (version 21.2).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams R.P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream (IL): Allured.
2. Adams R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL.
3. Bassole I.H.N., Ouattara A.S., Nebie R., Ouattara C., Costa-de-Oliveira S., Martinez-de-Oliveira J.C.A.T., Kabore Z.I., and Traore S.A. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*, 62:209-212.
4. Bates L.S., Waldren R.A. and Teare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207.
5. Bazzali O., Thai T.H., Hoi T.M., Khang N.S., Nguyen Thi H.J., Bighelli C.A. and Tomi F. (2016). Wood oil from *Xanthocyparis vietnamensis* Farjon et Hiep. Integrated analysis by chromatographic and spectroscopic techniques. *Molecules*, 21 (7), 840-851.
6. Burčul F., Generalić Mekinić I., Radan M., Rollin P. and lažević I.B. (2018). Isothiocyanates: Cholinesterase inhibiting, antioxidant, and anti-inflammatory activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 577-582.
7. Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S. and Hirata T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 62-68.
8. Davies N.W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*, 503, 1-24.
9. Ghazian F., Sadati S., Khanavi M. and Mohammad-Taghizadeh-Kashani L. (2016). Chemical composition, radical scavenging and β -carotene bleaching assay of essential oils from *Citrus aurantifolia*, *Citrus sinensis* Peel, and *Zataria multiflora* aerial parts. *Traditional and Integrative Medicine*, 1, 59-65.
10. Grover R.K. and Moore J.D. (1962). Toximetric studies of fungicides against brown rot organism: *S. fructicola* and *S. laxa*. *Phytopathology*, 52, 876–880.
11. Jennings W. & Shibamoto T. (1980). Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. New York: Academic Press.
12. Kanan R. (2012). Développements méthodologiques pour l'extraction et l'analyse des polluants organiques d'intérêt pour l'environnement marin: Application aux hydrocarbures

aromatiques polycycliques. Thèse de doctorat en Chimie analytique et environnement. École doctorale des sciences chimiques. Université Bordeaux 1, France. 233 p.

13. König W.A., Hochmuth D.H. and Joulain D. (2001). *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*, Library of Mass Finder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany.
14. Katalinic V, Milos M, Kulisic T. and Jukic M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94 (4), 550–557.
15. Lins L., Brasseur R., Malaisse W.J., Bieseman M., Verheyden P. and Willem R (1996). Importance of the hydrophobic energy: Structural determination of a hypoglycemic drug of the meglitinide family by nuclear magnetic resonance and molecular modeling. *Biochemical Pharmacology*, 52, 1155–1168.
16. Lim Y. & Quah E. (2007). Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chemistry*, 103, 734-740.
17. Liu Q., Yao H. (2007). Antioxidant activities of barley seed extracts. *Food Chemistry*, 102 (3), 732-737.
18. McDonald L.L., Guy R.H. and Speirs R.D. (1970). Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insects. Marketing Research Report No. 882. Washington (DC): Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture.
19. National Institute of Standards and Technology, 1998. Version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, NIST 98.
20. National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Perkin–Elmer Corp., Norwalk, CT (1999).
21. Prasad K., Laxdal V.A., Yu M. and Raney B.L. (1996). Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 154, 55-63.
22. Pisoschi A.M. & Negulescu G.P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1, 1-10.
23. Prieto P., Pineda M. and Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269 (2), 337-341.
24. Rahal K. (2005). Standardisation de L'antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale selon les recommandations de l'OMS, 4ème Ed, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.

25. Rangkadilok N., Sitthimonchai S., Worasuttayangkurn L., Mahidol C., Ruchirawat M. and Satayavivad J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (2):328-336.
26. Swigar A. & Silverstein R. (1981). Monoterpenes. Milwaukee (WI): Aldrich Chemical Co.; IV: 130 pp.
27. Stenhagen E, Abrahamsson S, McLafferty F. (1974). Registry of mass spectral data. J. Wiley & Sons, New York.
28. Tapondjou L.A., Adler C.F.D.A., Bouda H. & Fontem D.A. (2003). Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* et *Eucalyptus saligna* à l'égard de la bruche du niébé, *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera, Bruchidae). *Cahiers Agricultures*, 12 (6), 401-407.
29. Tomi F., Bradesi P., Bighelli A. and Casanova J. (1995). Computer aided identification of individual components of essential oil using carbon 13C-NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, 1, 25-34.
30. Tomi F. & Casanova J. (2006). 13C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review. In "The Labiatae: advances in Production, Biotechnology and Utilisation" Eds: cervelli C, Ruffoni B, Dalla Guda C. *Acta Horticulturae*, 723(723), 185-192.
31. Toudert-Taleb, K., Hedjal-Chebheb, M., Hami, H., Kellouche, A., & Debras, J.F. (2014). Composition of essential oils extracted from six aromatic plants of Kabyle origin (Algeria) and evaluation of their bioactivity on *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *African Entomology*, 22 (2), 417-427.
32. Tworkoski, T. (2002). Herbicide effects of essential oils. *Weed science*, 50(4), 425-431.
33. Singh H.P., Batish D.R. and Kohli, R.K. (2003). Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 239-311.

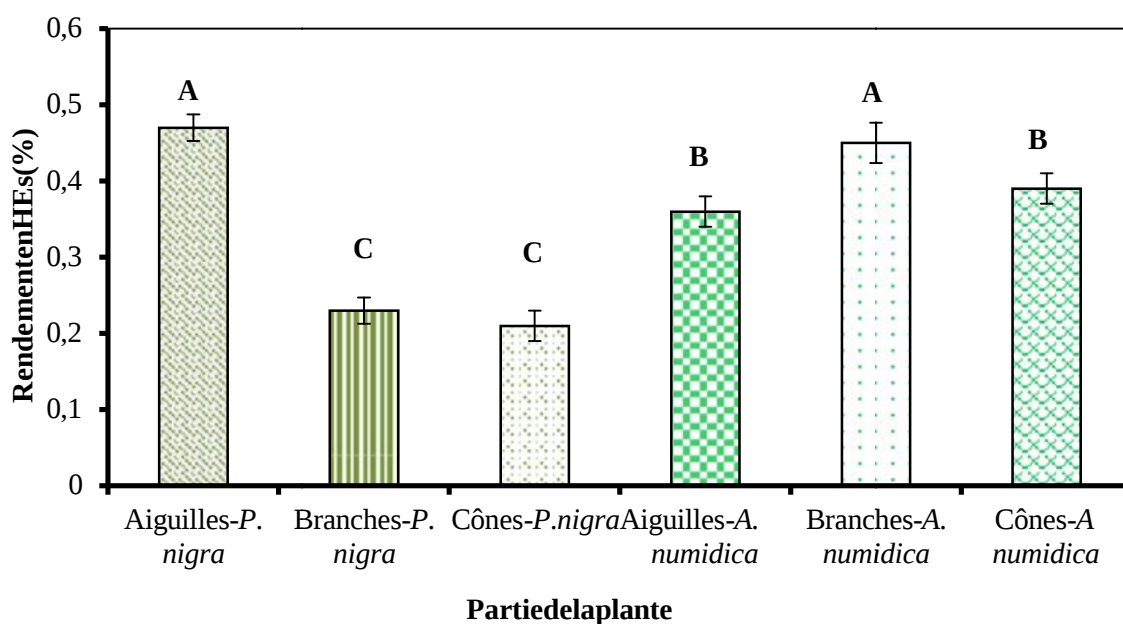
*Resultats
& Discussió
ns*

*I. Analyse des huiles
essentielles:
Propriétés
physicochimiques et
composition chimique*

I. Etude des huiles essentielles extraites de *P. nigra* et d' *A. numidica*

I.1. Le rendement

L'hydrodistillation des différents organes de plantes étudiées a fourni des huiles essentielles ayant des colorations variables allant du jaune clair au jaune-verdâtre avec de fortes et persistantes odeurs de Pinaceae. Les rendements en HE sont illustrés sur la Figure 31.



(Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ; $P \leq 0.05$)

Figure 31: Rendement en HEs des différentes parties de *P. nigra* et d' *A. numidica*.

Les valeurs représentent la moyenne des rendements de trois extractions séparées par organe végétal, exprimées en gramme d'huile essentielle par gramme de matériel végétal sec. Par la suite, les rendements ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA à un facteur) avec une comparaison de moyennes par le test de Student Newman-Keuls (SNK) par le logiciel SPSS 27 et les différences sont considérées significatives au seuil de $p \leq 0.05$. Par conséquent, selon les résultats obtenus, des différences statistiquement significatives ont été observées en fonction des espèces et de l'organe de la plante. Les rendements sont répartis en trois groupes :

Le premier groupe se compose des huiles essentielles obtenues à partir des aiguilles de *P. nigra* et des branches d' *A. numidica* affichant des rendements d'environ 0,47 % et 0,45 %, respectivement. Il s'agit des rendements les plus élevés pour ces deux espèces, avec une différence non significative au seuil de 5% selon le test (SNK).

Le second groupe, comparativement au précédent, s'individualise par les rendements légèrement faibles des HEs des aiguilles (0.36 %) et des cônes (0.39 %) d'*A. numidica*.

Le troisième groupe, se singularise par les organes produisant de faibles quantités d'essence. Il s'agit de branches (0.23 %) et de cônes de *P. nigra* (0.21%).

D'après les résultats cités dans la littérature, il est bien établi que les Pinaceae sont connus pour contenir des huiles essentielles. En comparant séparément les rendements des huiles essentielles obtenus au cours de notre étude avec ceux rapportés par d'autres chercheurs, nous avons fait les constats suivants. Les résultats de la faible production quantitative des huiles essentielles des deux espèces de Pinaceae étudiées sont du même ordre de grandeur que les études rapportées par (Macchioni et al., 2003) sur les huiles essentielles de la partie aérienne de *P. nigra* au centre de l'Italie. Ces auteurs ont montré que la teneur en huile essentielle de cette espèce est de 0.23% pour les aiguilles, de 0.28% pour les branches et de 0.03% pour les cônes. Des rendements similaires ont également été obtenus par Bonesi et al., (2010), sur les aiguilles de *Pinus nigra* subsp. *nigra* et de *P. nigra* var. *calabrica*, avec des teneurs de l'ordre de 0.3 et de 0.2 %, respectivement. A contrario, en Tunisie (Amri et al., 2017), les aiguilles de la sous espèce *laricio* ont donné un rendement (0.66 %), beaucoup plus meilleur que celui enregistré par la sous espèce *mauretanica* de la présente étude. Politeo et al., (2011^b), en étudiant les aiguilles de *P. nigra* subsp. *dalmatica*, une endémique des régions côtières de la Croatie, ont obtenu un rendement élevé en HEs de l'ordre de 0.77%. De même, Dogan & Bagci (2018), en analysant les HEs des branches de *P. nigra* subsp. *pallasiana* de quatre régions en Turquie, ont enregistré des taux élevés d'extraction allant 0.5 à 0.9 %. Les HEs des aiguilles et des branches de *P. nigra* de trois provenances, en Italie, ont présenté des rendements qui varient de 0.44 à 0.80% et 0.56 à 0.90%, respectivement (Vidrich et al., 1996).

Pour *A. numidica*, une légère fluctuation dans les rendements en HEs a été observée, qui semble dépendre de l'organe végétal et de la région d'étude (variation suite à l'adaptation aux conditions environnementales). Ainsi, les HEs des aiguilles d'*A. numidica* acclimatées dans les hauteurs de Seraïdi (Annaba, Algérie), ont produit un rendement presque similaire à celui obtenu dans la présente étude, soit environ 0.37 % (Tlili Ait-Kaki et al., 2013). En revanche, Ramdani et al., (2014) ont rapporté un taux de 0.4% avec les branches feuillées de la population naturelle des monts Babor (Sétif, Algérie). De plus, les aiguilles séchées et broyées d'*A. numidica*, introduite à Djebel Ouahch (Constantine, Algérie) ont produit un rendement de 0.592% (Benouchenne et al., 2022), nettement plus élevé que celui de Tababourt, dans la

présente étude. Ces variations de rendement soulignent l'influence des conditions environnementales et de la partie de la plante sur la production d'huiles essentielles. Cela suggère que l'adaptation d'*A. numidica* à différents environnements peut entraîner des modifications dans la production d'huiles essentielles, ce qui pourrait avoir des implications pour l'utilisation de cette plante dans diverses applications.

D'autres espèces du genre *Abies* sont connues pour leurs rendements très faibles en huile essentielle. C'est le cas de : *Abies equi-trojani*, *A. cilicica*, *A. nordmannia* et *A. bormülleriana*, natives de la Turquie, où des rendements allant de 0.42-0.59% ont été obtenus à partir des cônes (Tumen et al., 2009). Par contraste, des rendements élevés ont été rapportés dans plusieurs études sur les HEs de ce genre. Ainsi, les aiguilles d'*A. sachalinensis* ont produit un rendement de 1% en HEs (Satou et al., 2011). De même, en Chine, *A. nephrolepis* a donné 3.6% d'HEs à partir des aiguilles (Li et al., 2005).

Les différences de rendement en huiles essentielles d'un organe à un autre ou d'une espèce à une autre ont été rapportées. L'origine de l'espèce, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en huile essentielle (Vekiari et al., 2002; Karousou et al., 2005 ; Kouamé, 2012; Singh et al., 2012). D'autres facteurs tels que les traitements auxquels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique ou enzymatique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (Morin et al., 1985).

1.2. Propriétés physicochimiques

Conformément aux directives de l'Afssps, aux pharmacopées européennes, ainsi qu'aux normes ISO et AFNOR, les contrôles physicochimiques des huiles essentielles sont indispensables pour évaluer leur qualité. Ces contrôles sont nécessaires non seulement pour des raisons de sécurité lors du transport et du stockage, mais aussi pour la protection des consommateurs et pour garantir l'intégrité des transactions commerciales. La qualité des huiles essentielles est évaluée à travers une série d'analyses physiques et organoleptiques telles que la couleur, l'odeur, le goût, la viscosité, la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, le point d'éclair, etc., des analyses chimiques (comme l'indice d'acide, l'indice d'ester, l'indice de saponification, l'indice de carbonyle, l'indice de peroxyde et certains dosages spécifiques) ainsi que des caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques (Fernandez et al., 2012 in Fernandez et Chemat, 2012; Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

Les résultats des caractéristiques physicochimiques étudiées sont regroupés dans le **Tableau 4** ci-après.

Tableau 4 : Propriétés physicochimiques des huiles essentielles des trois parties de *P. nigra* et d'*A. numidica*.

Paramètre étudié	<i>Pinusnigra</i>			<i>Abiesnumidica</i>		
	Partiedela plante					
	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
Densite(d²⁰) ₂₀	0.767	0.866	0.848	0.85	0.854	0.837
Indicederéfraction(n²⁰ _D)	1.653	1.675	1.679	1.671	1.665	1.667
Indiced'acide(I_A)	14.6	17.7	10.6	6.1	2.3	4.02
Indicedeperoxyde (I_P)	1.9	1.78	7.76	1.64	1.36	8.71

L'examen du tableau ci-dessus, montre que les caractéristiques physicochimiques avoisinent dans l'ensemble les normes de commercialisation des huiles essentielles. Elles varient suivant la partie de la plante utilisée. La densité relative se situe entre 0,767 pour les aiguilles et 0,866 pour les branches de *P. nigra*. Tandis que *A. numidica* a produit des HE dont les densités relatives varient entre 0.837 pour les cônes et 0.857 pour les aiguilles. Les indices de réfraction sont très rapprochés et varient entre 1.653 pour les aiguilles (*P. nigra*) et 1.665 pour les branches (*A. numidica*). Ces valeurs sont élevées par rapport à celles d'autres huiles rapportées dans la littérature scientifique. Pour certains auteurs, l'indice de réfraction d'une huile essentielle varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés et une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé et lui confère une réfraction élevée de la lumière ([Kanko et al, 2004](#) ; [Boukhatem et al., 2010](#) ; [Bourkhiss et al, 2015](#)).

Pour les propriétés chimiques, l'indice d'acide est élevé pour tous les organes (2.3 -17.7) ce qui pourrait être attribué soit à la présence d'acides libres, soit à une hydrolyse des esters ([Kanko et al, 2004](#); [Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012](#)) lors de la conservation à 4 °C. En revanche, l'indice de peroxyde, s'individualise par des valeurs élevées pour les cônes (7.76 – 8.71) comparativement aux autres parties des deux espèces. Le Codex Alimentarius, un ensemble de normes internationalement reconnues relatives aux aliments, à la production alimentaire et à la sécurité alimentaire, suggère un indice de peroxyde maximal de 10 milliéquivalents de peroxyde par kilogramme d'huile (10 mEq O₂/Kg) pour les huiles vierges ou pressées à froid ([Kabouré et al., 2022](#)). Toutefois, cette valeur n'est pas spécifique aux huiles essentielles et peut varier en fonction du type d'huile et de l'usage auquel elle est destinée. Cet

indice est un indicateur de degré d'oxydation et d'altération des huiles essentielles (Fernandez et al., 2012 in Fernandez et Chemat, 2012; Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

1.3. Etude de la composition chimique des huiles essentielles

Les extraits des deux plantes ont été analysés par des équipements différents. Pour les HEs et les composés volatiles des aiguilles et des branches de *P. nigra*, la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-EIMS) a été employée. En revanche, pour les HEs des cônes et des trois parties d'*A. numidica*, une combinaison de techniques a été utilisée, notamment la GC-EIMS, la chromatographie en phase gazeuse avec détection à ionisation de flamme (GC-FID) et la résonance magnétique nucléaire du carbone 13 (RMN ^{13}C).

1.3.1. *Pinus nigra* ssp. *mauretanica*

L'extraction et l'étude analytique des différentes parties de *P. nigra* a été menée différemment. En plus de la méthode conventionnelle (hydrodistillation) et à des fins de comparaison de la composition chimique, la Micro Extraction en Phase Solide dans l'Espace de Tête (HS-SPME) a été utilisée uniquement pour l'obtention des composés volatiles à partir des aiguilles et des branches de *P. nigra*.

1.3.1.1. Aiguilles et branches

L'analyse de la composition chimique de l'HE des aiguilles et des branches de *P. nigra* a permis d'identifier 99 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0.01%, représentant respectivement plus de 98% (83 composés identifiés) et de 97% (91 composés identifiés) de la composition totale des HEs (Tableau 5).

Tableau 5 : Composition chimique des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des aiguilles et des branches de *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* (Mair. & Pey.) (Pinaceae).

<i>R.T.</i>	<i>L.R.I.</i>	Composés	Aiguilles	Branches
3.22	856	(E)-2-hexenal	tr	tr
3.42	869	1-hexanol	tr	tr
3.73	889	Santene	-	tr
4.02	901	Heptanal	-	tr
4.48	928	Tricyclene	tr	0.2
4.55	931	α -thujene	tr	tr
4.72	939	α -pinene	9.4	55.7
5.07	953	Camphene	0.1	1.8
5.20	957	Thuja-2,4(10)-diene	tr	0.5
5.37	961	Benzaldehyde	tr	tr
5.69	976	Sabinene	-	tr
5.78	980	β -pinene	0.5	2.3
6.04	985	6-methyl-5-hepten-2-one	tr	tr
6.13	991	Myrcene	1.5	0.9
6.54	1005	α -phellandrene	tr	tr
6.91	1018	α -terpinene	tr	tr
7.16	1027	p-cymene	tr	0.2
7.30	1031	Limonene	0.5	1.4
7.40	1035	1,8-cineole	tr	tr
7.58	1041	(Z)- β -ocimene	tr	0.1
7.93	1052	(E)- β -ocimene	tr	tr
8.30	1062	γ -terpinene	tr	tr
9.35	1089	Terpinolene	tr	0.2
9.78	1100	Linalool	0.4	tr
9.99	1103	Nonanal	tr	tr
10.30	1117	Exo-fenchol	-	tr
10.61	1123	Cis-p-menth-2-en-1-ol	tr	tr
10.80	1127	α -campholenal	tr	0.6
11.30	1141	Trans-pinocarveol	tr	0.9

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

11.54	1143	Cis-verbenol	tr	1.7
12.25	1162	Trans-pinocamphone	-	tr
12.27	1164	Pinocarvone	-	tr
12.44	1166	p-mentha-1,5-dien-8-ol	0.2	1.1
12.73	1175	Cis-pinocamphone	-	tr
12.86	1179	4-terpineol	tr	tr
13.20	1185	p-cymen-8-ol	tr	tr
13.42	1191	α -terpineol	0.4	0.6
13.58	1192	Dihydro-carveol	tr	tr
13.67	1194	myrtenal	tr	0.7
14.27	1206	Verbenone	tr	0.4
14.61	1219	trans-carveol	tr	0.3
15.11	1231	Cis-carveol	-	tr
15.69	1244	Carvone	-	tr
15.85	1247	Carvotanacetone	-	tr
17.50	1286	Isobornylacetate	0.2	0.5
17.80	1292	Thymol	tr	tr
17.94	1294	Trans-verbenylacetate	tr	-
18.12	1299	Trans-pinocarvylacetate	tr	-
18.20	1300	Carvacrol	-	0.4
19.22	1314	Myrtenylacetate	tr	-
19.31	1321	Neo-iso-verbanolacetate	tr	tr
20.22	1351	α -cubebene	0.4	tr
21.13	1370	Cyclosativene	0.2	tr
21.32	1376	α -copaene	0.5	tr
21.70	1384	β -bourbonene	0.2	0.4
21.79	1386	Geranylacetate	0.3	-
21.96	1390	β -cubebene	0.2	tr
22.05	1392	β -elemene	0.3	tr
22.67	1403	Methyleugenol	0.2	tr
23.17	1418	β -caryophyllene	26.2	1.8
23.58	1432	β -gurjunene	0.6	-
24.22	1439	α -guajene	-	tr

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

24.32	1447	Cis-muurola-3,5-diene	tr	-
24.59	1455	α -humulene	4.1	0.3
24.85	1459	(E)- β -farnesene	tr	tr
24.99	1462	Cis-muurola-4(14),5-diene	0.2	tr
25.19	1467	9-epi-(E)-caryophyllene	tr	tr
25.60	1477	γ -muurolene	3.1	0.5
25.76	1480	Germacrene D	17.2	1.9
25.96	1485	β -selinene	0.5	tr
26.26	1489	Phenylethyl 3-methyl-butanoate	1.1	0.5
26.33	1492	Valencene	2.1	tr
26.59	1499	α -muurolene	0.9	0.1
26.74	1503	Germacrene A	0.1	-
27.00	1508	(E,E)- α -farnesene	tr	tr
27.13	1513	Trans- γ -cadinene	2.6	0.2
27.27	1520	Isobornyl 2-methylbutyrate	-	0.5
27.54	1524	δ -cadinene	6.9	0.9
27.87	1532	Trans-cadina-1(2),4-diene	0.3	tr
28.08	1538	α -cadinene	0.3	tr
28.34	1550	Cis- α -bisabolene	0.2	-
29.21	1565	Trans-nerolidol	0.3	tr
29.59	1575	Germacrene D-4-ol	0.8	tr
29.87	1581	Caryophyllene oxide	1.3	0.7
30.92	1606	Humulene epoxide II	0.2	tr
31.15	1614	1,10-di-epi-cubenol	0.1	-
31.67	1629	1-epi-cubenol	tr	tr
32.20	1641	Tau-cadinol	1.2	0.1
32.39	1645	α -muurolol	0.2	tr
32.69	1654	α -cadinol	1.4	0.4
42.61	1929	Cembrene	2.4	2.3
42.96	1941	Pimaradiene	-	tr
43.08	1975	Sclarene	0.9	1.2
43.60	1959	(3Z)-cembrene A (=neocembrene)	0.3	0.4
44.60	1989	Manoyloxide	tr	0.6

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

45.30	2010	Epi-13-manool	0.3	0.5
46.53	2034	Kaur-16-ene(=phyllocladene-)	7.1	12.4
47.46	2080	Abietadiene	-	0.2
50.04	2185	Sandaracopimarinal	-	0.6
Total			98.4%	97.0%

^{a)} **RT**: Temps de rétention, ^{b)} **LRI**, indices de rétention linéaire déterminés sur colonne capillaire DB-5, ^{c)} **tr**: trace, ^{d)} -: rétention non détectée.

Globalement, compte tenu du grand nombre de composés détectés, l'étude de la composition chimique des huiles essentielles extraites des aiguilles de *P. nigra* a montré une prédominance des sesquiterpènes hydrocarbonés (67,1%) et, dans une moindre mesure, de leurs dérivés oxygénés (5,5 %). Les monoterpènes constituaient 12,0 % (composés hydrocarbonés) et 1,5% (dérivés oxygénés). Concernant les diterpènes, les hydrocarbonés représentaient 10,7% et les oxygénés moins de 1%, du total des composés identifiés pour cette classe de terpènes (Figure 32).

L'analyse des HEs des branches a mis en évidence un taux élevé de composés hydrocarbonés. Ce groupement était réparti en mono (63,3%), sesqui (6,1%) et di (16,5%) terpènes. En revanche, les composés oxygénés ont été nettement supérieurs à ceux des aiguilles et varient de 1,2 % (sesquiterpènes) à 7,2 % (monoterpènes).

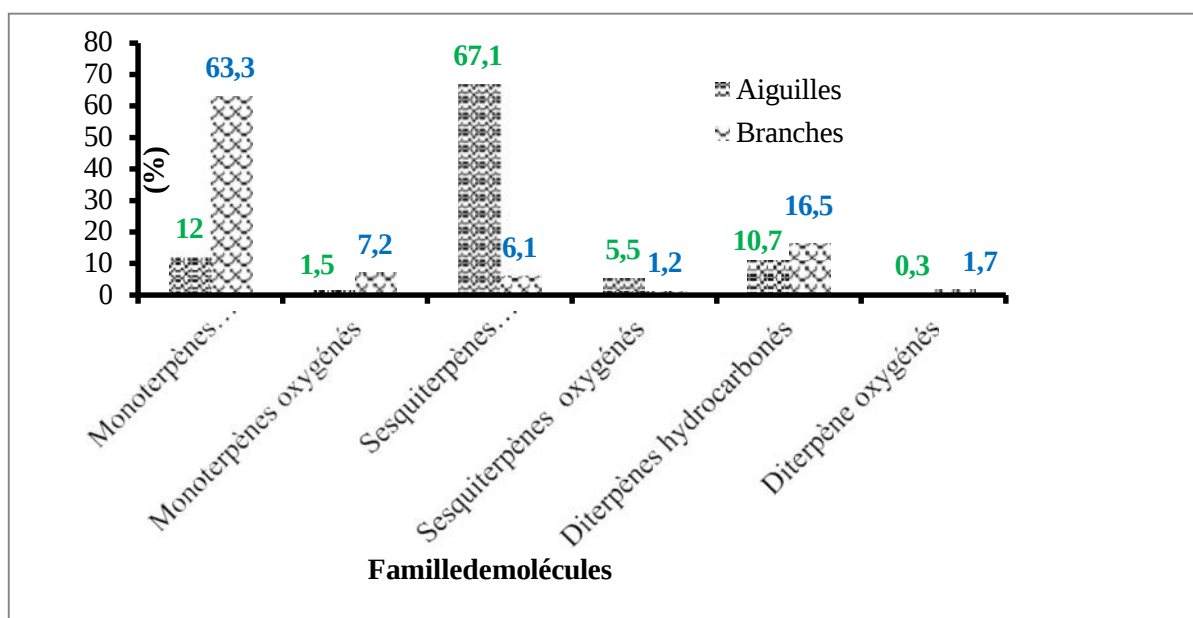


Figure 32: Répartition des familles de molécules présentes dans les HEs des aiguilles et des cônes de *P. nigra* obtenues par hydrodistillation.

En effet, les principaux constituants de l'huile essentielle des aiguilles étaient le β -caryophyllène (26,2%), le germacrène D (17,2%), l' α -pinène (9,4%), le phyllocladène (7,1%), le δ -cadinène (6,9%) et l' α -humulène (4,1%), tandis que l' α -pinène (55,7%), le phyllocladène (12,4%), le cembreène (2,3%) et le β -pinène (2,3%) étaient les composés majoritaires pour les branches. En somme, des différences qualitatives et quantitatives entre les HEs extraites des deux parties de *P. nigra* ont été mises en évidence (voir **Tableau 5** et **Figure 32**).

Les composés volatils des deux parties de *P. nigra* obtenus par MicroExtraction en Phase Solide dans l'Espace de Tête (HS-SPME) ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-EIMS). Comme le mentionnent **Tumen et al., (2010)** en comparant les deux techniques, il semble que la SPME (une technique innovante, plus rapide, plus sensible et sans solvant), soit plus sensible pour les composés de faible poids moléculaire qui sont plus volatils, tandis que la distillation à la vapeur (hydrodistillation : HD) permet d'obtenir la majorité des composés (**Tableau 6**). La littérature fait état de différences qualitatives et quantitatives entre les composés volatils obtenus par SPME et par les méthodes conventionnelles (HD) (**Yang et al., 2010^b**; **Chizzola & Müllner, 2021**). Les différences dans nos résultats peuvent s'expliquer par le paramètre de température utilisé dans la procédure d'extraction (75°C pour la SPME et plus de 100°C pour la distillation à la vapeur). Il convient de mentionner que nous n'avons utilisé qu'un seul type de fibre dans l'extraction SPME, de sorte que d'autres études comparatives devraient être réalisées avec différentes fibres pour s'assurer de la sensibilité des deux méthodes. En effet, contrairement à l'HD, la SPME a révélé beaucoup plus de composés volatils (hydrocarbures mono et sesquiterpènes), un faible pourcentage de composés oxygénés (< 0,5 %), l'absence de composés volatils de poids moléculaire élevé (diterpènes) et une nouvelle classe de métabolites (acides gras) dépassant 40 % (**Figure 33**).

Tableau 6 : Composition chimique des composés volatiles des aiguilles et des branches de *P. nigra* ssp. *mauretanica* obtenues par SPME.

<i>R.T.</i>	<i>L.R.I.</i>	Composés	Aiguilles	Branches
2.63	800	hexanal	-	0.3
4.82	939	α -pinene	29.9	88.5
5.15	953	camphene	-	0.5
5.88	980	β -pinene	1.8	2.5
6.23	991	myrcene	6.7	1.7
7.24	1027	p-cymene	-	Tr
7.37	1031	limonene	-	3.3
7.39	1033	β -phellandrene	3.2	-
7.65	1041	(Z)- β -ocimene	0.2	0.2
8.01	1052	(E)- β -ocimene	0.4	-
9.43	1089	terpinolene	0.2	0.1
9.85	1100	linalool	0.2	-
10.03	1103	nonanal	tr	0.1
10.98	1129	allo ocimene	tr	Tr
12.74	1173	menthol	tr	-
14.14	1205	decanal	tr	Tr
17.56	1286	isobornylacetate	tr	0.1
17.98	1294	trans-verbenylacetate	tr	-
18.17	1299	trans-pinocarvylacetate	tr	-
19.36	1321	neo-iso-verbanolacetate	tr	-
20.28	1351	α -cubebene	0.2	-
21.18	1370	cyclosativene	tr	-
21.37	1376	α -copaene	0.2	-
21.75	1384	β -bourbonene	tr	-
22.09	1392	β -elemene	0.2	-
23.21	1418	β -caryophyllene	6.6	0.4
23.62	1432	β -gurjunene	0.2	-
24.63	1455	α -humulene	1.1	Tr
25.03	1462	cis-muurola-4(14),5-diene	tr	-

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

25.63	1477	γ -muurolene	0.4	Tr
25.79	1480	germacrene D	2.7	0.1
26.00	1485	β -selinene	tr	-
26.37	1492	valencene	0.3	-
26.62	1499	α -muurolene	tr	-
27.17	1513	trans- γ -cadinene	0.2	-
27.57	1524	δ -cadinene	0.4	Tr
29.91	1581	caryophyllene oxide	tr	-
36.98	1770	tetradecanoic acid	1.4	-
40.50	1871	pentadecanoic acid	1.8	-
42.60	1927	methyl hexadecanoate	0.5	-
43.15	1935	cyclohexadecanolide	1.3	-
44.20	1970	hexadecanoic acid	37.6	-
50.24	2177	octadecanoic acid	0.5	-
58.84	2400	tetracosane	-	1.9

a) **RT**: Temps de rétention, ^{b)} **LRI**, indices de rétention linéaire déterminés sur colonne capillaire DB-5, ^{c)} **tr**: trace, ^{d)} -: rétention non détectée

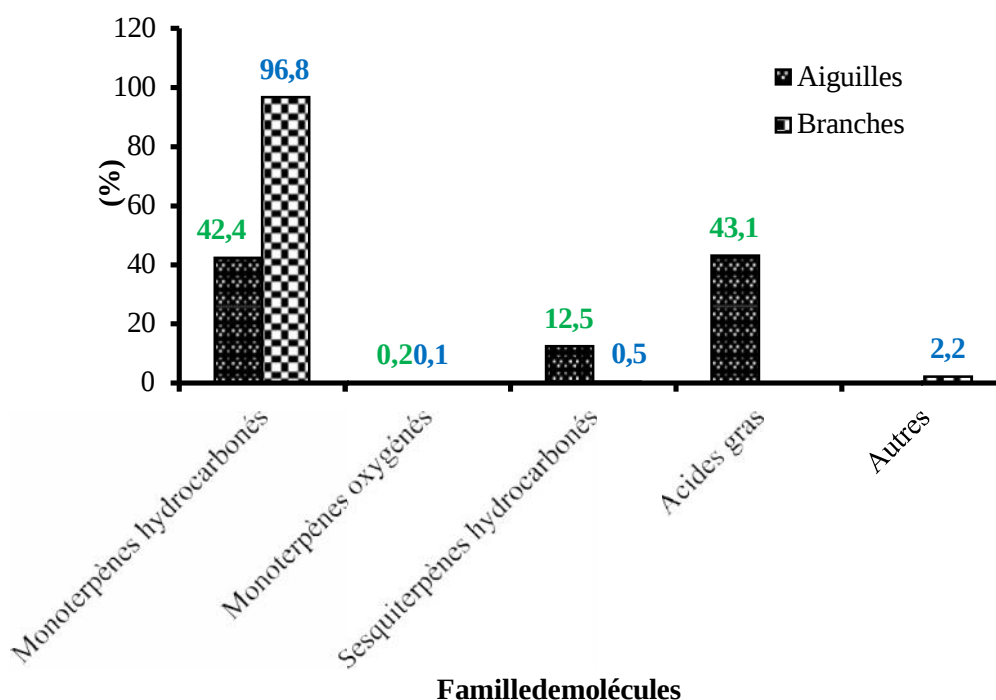


Figure 33: Répartition des familles de molécules présentes dans les composés volatiles des aiguilles et des cônes de *P. nigra* obtenues par SPME.

La plupart des HEs étudiées des sous-espèces de pin noir se composent principalement d'une abondance de monoterpènes (α -pinène, β -pinène, limonène, δ -3-carène et β -phellandrène) et de sesquiterpènes (germacrène D ou β -caryophyllène). Il convient de mentionner que les principaux composés cités ci-dessus ont été trouvés dans des différences quantitatives remarquables dans la plupart des données disponibles sur les sous-espèces de *Pinus nigra* dans le monde (**Tableau 7**). Plusieurs auteurs ont signalé que l' α -pinène, le germacrène D et le β -pinène étaient les composants dominants présents dans les HEs de pins noirs (**Kubeczka & Schultze, 1987** ; **Roussis et al., 1995** ; **Ioannou et al., 2014**). Dans la plupart des cas, tous les profils sont construits sur l' α -Pinène comme composé majeur dont le taux de contenu a atteint le seuil de 60% dans *P. nigra* var. *banatica* de Serbie (**Šarac et al., 2014**). Il est intéressant de noter un profil moins fréquent qui mérite d'être mentionné dans les résultats des études sur les HEs de pin noir: le 1-épibicyclosquiphellandrène s'est révélé dominant dans les échantillons prélevés sur deux sites italiens, le Frioul et les Abruzzes (**Vidrich et al., 1996**).

Le composant majoritaire des HEs peut révéler des constituants totalement différents à un niveau plus élevé, comme dans le cas des aiguilles de *P. nigra* ssp. *larici* de Corse où l'oxyde de manoyl (63%), un composé d'intérêt potentiel pour la parfumerie et les industries pharmaceutiques (**Koukos et al., 2001**). Dans notre étude, le composant majoritaire des HEs extraites des aiguilles est totalement différent de ceux des données disponibles dans le monde.

où le β -caryophyllène présentait une valeur relativement élevée (26,2 %). Parallèlement, cette étude a révélé que malgré le fait que la composition des HEs varie dans les deux parties aériennes étudiées, la quantité et la qualité des HEs isolées des aiguilles en comparaison avec les données rapportées (**Tableau 7**) suggèrent la présence d'un nouveau chémotype pour le *P. nigra* ssp. *mauretanica* avec l'ordre chimique suivant :

β -Caryophyllène (26,2%) > Germacrène D (17,2 %) > α -Pinène (9,4 %) > Phyllocladène (7,1 %) > δ -cadinène (6,9 %) > α -Humulène (4,1 %) > γ -Muuroène (3,1 %).

Enfin, dans les HEs des branches, les principaux composés sont l' α -pinène, suivi du phyllocladène et du β -pinène, un profil plus proche des données rapportées par [Macchioni et al., \(2003\)](#) avec *P. nigra* dans les provinces italiennes de Massa. Il est bien établi que les HEs de plantes de la même espèce peuvent varier dans leur composition en fonction de facteurs exogènes et endogènes ([Barra, 2009](#)) et les conifères n'échappent pas à cette règle. Ces variations quantitatives et qualitatives entre sous-espèces dans le monde entier doivent être prises en compte et peuvent être pertinentes, par exemple, dans les études chimiotaxonomiques en tant qu'approche complémentaire, car l'ambiguïté persiste dans les approches botaniques classiques. L'influence du procédé d'extraction sur la labilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal.

Tableau 7 : Diversité de la composition chimique (chimiotype) des huiles essentielles de *P. nigra* en fonction de l'organe, du pays et de sous-espèce.

Aiguilles			
Espèce/sous-espèce	Origine (Pays, region)	Chémotypes (composés majeurs)	Auteur(s)
<i>P. nigra</i> sp. <i>pallasiana</i>	Bartin, Turkey.	α -pinene (27.46%) > β -caryophyllene (11.03%) > germacrene D (7.14%) > sabinene (5.52%) > γ -muurolene (4.98%) > β -pinene (4.42%).	Kozanet al., 2019
	Mileševka, Serbia.	α -pinene (24.6%) > germacrene D (25.4%) > (E)-caryophyllene (13.2%) > β -pinene (8.8%) > α -terpinyl acetate.	Mitić et al., 2018.
	Royal Botanical Garden of Madrid, Spain.	α -pinene (42.33%) > germacrene D (30.59%) > (E)-caryophyllene (7.43%) > β -pinene (5.15%).	Šarac et al., 2014.
<i>P. nigra</i> sp. <i>pallasiana</i> var. <i>pyramidata</i>	Vakif Ormani, Anatolia, Turkey	α -pinene (28.3%) > germacrene D (17.3%) > β -caryophyllene (12.9%) > β -pinene (5.61%) > δ -cadinene (4.13%).	Ucar & Balaban, 2004.
<i>P. nigra</i> sp. <i>pallasiana</i> var. <i>pallasiana</i>	Anatolia, Turkey	α -pinene (29%) > germacrene D (14.9%) > β -caryophyllene (12.9%) > β -pinene (9.43%).	
<i>P. nigra</i> sp. <i>laricio</i>	Corsica, France	α -pinene (22%-41%) > germacrene D (17.8%-8.6%) > myrcene (3.6%-7.7%) > (E)-caryophyllene (5.3%-6.3%) > limonene (2.9% - 5.1%).	Rezzi et al., 2001.
	Cambridge University Botanic Garden, UK	α -pinene (18%) > δ -3-carene (16.1%) > β -caryophyllene (13.9%) > germacrene D (12.7%) > limonene (9.7%).	Ioannou et al., 2014.

<i>P. nigrasp. laricio</i>	Souinet arboreta of the National Institute of Researches on Rural Engineerin, Water and Forests, Tunisia	manool oxide (38 %) > germacrene D (16.7%) > δ -cadinene (9 %) > (E)-caryophyllene(8.9%)> α -cadinol(4.3%).	Amrietal., 2017.
<i>P. nigrasp. caramanica</i>	Cambridge University Botanic Garden, UK	β -pinene(20.7%)>germacreneD(20.0%)> α -pinene(18%)> β -caryophyllene(7.8 %).	Ioannouet al., 2014.
<i>P. nigrasp. nigra</i>	Serbia	α -pinene(45.93%)>germacreneD(28.1%)> β -pinene(6.90%)>(E)-caryophyllene(7.4%).	Šaracetal., 2014.
	Mileševka, Serbia	α -pinene(35.4%)>germacreneD(28.1%)> β -pinene(10%)>(E)-caryophyllene (7.4%).	Mitićetal., 2018.
	Royal Botanical Garden of Madrid, Spain	germacreneD(32.1%) α -pinene(19.5%)> β -caryophyllene(16.1%)> β -pinene (12.1 %).	Ioannouet al., 2014.
	Sila, Calabria, Italy	α -pinene(25.3%)>limonene(22.6%)>sabinene(12.8%)> α -terpineol(8.3%)> β -pinene(4.8%)>terpinolene(4.5%).	Bonesiet al., 2010.
<i>P. nigrasp. salzmanii</i>	Cambridge University Botanic Garden, UK	germacreneD(18.5%)> β -caryophyllene (17.8 %) > limonene (12.5 %) > α -pinene (12.2 %) > β -pinene (4.1 %).	Ioannouet al., 2014.

<i>P. nigrasp. dalmatica</i>	Central Dalmatia Vidova gora, island Brac, Croatia	α -pinene (24.3 %) β -pinene (16 %) > germacrene D (14.6 %) > β -caryophyllene (9.6%) > limonene (3.3%) > bornylacetate (3.3 %).	Politeo et al., 2011^a.
<i>P. nigra var. banatica</i>	Serbia	α -pinene (58.83%) > germacrene D (23.69 %) > (E)-caryophyllene (7.31 %) > limonene (5.04%) > β -pinene (3.10%).	Šarac et al., 2014.
<i>P. nigrasp. calabrica</i>	Parco Nazionale del Pollino, Calabria, Italy	α -pinene (24.6 %) β -pinene (10.9 %) > γ -cadinene (9.9%) > β -phellandrene (6.3%) > manoyl oxide (6.2 %) > trans-caryophyllene (4.2%).	Bonesi et al., 2010.
<i>P. nigra</i>	Zagreb, Croatia	α -pinene (42.66%) > germacrene D (17.72%) > β -pinene (11.64%) > β -caryophyllene (5.62%).	Idžojić & Pfeifhofer, 2001.
	Central Italy	α -pinene (28.4%) > germacrene D (21.2%) > β -caryophyllene (16.2%) > β -pinene (6.2%).	Macchioni et al., 2003.
	Calabria, Italy	α -pinene (35.14 %) > 1-epibicyclosesquiphellandrene (30.93%) > β -caryophyllene (5.26%) > β -pinene (2.80%) > δ -cadinene (1.94%) > p-menth-1-en-8-yl acetate (1.74%).	Vidrich et al., 1996.
	Abruzzo, Italy	1-epibicyclosesquiphellandrene (23.40 %) > α -pinene (17.64%) > β -caryophyllene (11.82 %) > β -pinene (4.40 %) > δ -cadinene (3.19 %) > p-menth-1-en-8-yl acetate (2.88%) > α -humulene (1.74%).	

	Friuli, Italy	1-epibicyclosiquiphellandrene(36.84 %) > α -pinene (11.52 %) > β -caryophyllene (9.88%) > β -pinene(2.38%) > δ -cadinene (2.20 %) > <i>p</i> -menth-1-en-8-yl acetate (1.82%) > terpinolene (1.46 %) > α -humulene(1.45%)>limonene(1.44%).	
<i>P.nigrasp. mauretanica</i>	Parc National du Djurdjura (PND), Algérie	β -caryophyllene (26.2 %) > germacrene D (17.2 %) > α -pinene (9.4 %) > phyllocladene(7.1%)> δ -cadinene(6.9%) > α -humulene(4.1%)> γ -muurolene (3.1%).	Présente étude.
Branches			
Espèce/sous-espèce	Origin (Pays, region)	Chemotype(composés majeurs)	Auteur(s)
<i>P.nigrasp. pallasiana</i>	Adana, Turkey	germacreneD(23.5%)> α -pinene(20%) > δ -3-carene(10.2%)> β -caryophyllene (8.8 %) > limonene (5.5 %).	Dogan & Bagci (2018)
	Adiaman, Turkey	germacreneD(23%)> α -pinene(18.5%) > β -Caryophyllene(14.5%)> β -pinene (13.5 %) > limonene (5.3 %).	
	Antalya, Turkey	β -pinene (35.2 %) > α -pinene (32 %) > limonene(7.5%)>germacreneD(6.2%) > β -caryophyllene(5.2%).	
	Elazig, Turkey	α -pinene(22.2%)> β -pinene(12.3%)> α -cubebene (6.3 %) > δ -3-carene (6.1 %) > caryophyllene oxide (5.1 %) > limonene (4.5%)> β -caryophyllene(4.1%).	
<i>P.nigra</i>	Tuscany, Italy	α -pinene(70%)>dihydrocarvone(4.6%) > carvone(2.5%)> β -pinene(2.2%)> limonene / γ -terpinene (1.8%).	Macchioni et al., 2002.
	Pian della Fioba	α -pinene(61.7%)>phyllocladene (11.8%) > β -pinene(2.8%)>isobornyl acetate	Macchioni et al., 2003.

	(Massa), Central Italy	(2.1%)>camphene(1.6%)>limonene (1.3 %)> myrcene (1 %).	
	Calabria, Italy	α -pinene(74.63%)> β -Pinene(2.58%)> isobornyl acetate (1.33 %) > camphene (1.22%).	Vidrichet <i>al.</i> , 1996.
<i>P.nigra</i>	Abruzzo, Italy	α -pinene(74.63%)>limonene(5.96%)> β -caryophyllene(4.18%) β -pinene (2.99%)>isobornylacetate (1.26%).	Vidrichet <i>al.</i> , 1996.
	Friuli,Italy	α -pinene(47.18%)>limonene(6.44%) β -pinene (2.35 %) > p-menth-1-en-8- yl acetate (2.04 %) > isobornyl acetate (1.32%).	
<i>P.nigrasp. mauretanica</i>	Parc Nationaldu Djurdjura (PND), Algerie	α -pinene(55.7%)>phyllocladene(12.4%) β -pinene / cembrene (2.3 %) > Germacrene D (1.9 %) > camphene / β -caryophyllene (1.8 %) > cis-verbenol (1.7 %) > limonene (1.4%)>sclarene(1.2%).	Présente étude

I.3.1.2. Lescônes

Les analyses chimiques (Tableau 8) ont permis d'identifier 39 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0.01%. Ces 39 composés ont une aire cumulée correspondant à 84.9% des aires cumulées de l'ensemble des constituants de l'HE. Celle-ci se composait entièrement de dérivés terpéniques. Neuf (09) hydrocarbures monoterpéniques (63.2 %) ont été identifiés, dont le plus important était l' α -pinene (58.1 %) tandis que les oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones et esters) représentaient 4.9% de l'ensemble des constituants de l'HE. Les sesquiterpènes hydrocarbonés constituaient 5.7 % de l'HE, le plus important étant le (*E*)- β -caryophyllène (5.7 %) alors que les oxygénés représentés par le groupe fonctionnel époxydes tenaient une valeur combinée de 4.2 %. Parmi les diterpènes, deux (02) hydrocarbures (4 %) ont été identifiés. Il s'agissait de l'abiatatriène (2.3 %) et l'abiatadiène (1.7 %). La fraction oxygénée de cette classe (2.6 %) était dominée par les aldéhydes dont le plus important est le déhydro abiétal (1.3 %) (Figures 34, 35).

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

Tableau 8 : Composition chimique des HES des cones de *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* (Mair. & Pey.) (Pinaceae)

N°	Composés	RIa	RIa(lit)	RIp	RIp(lit)	Famille chimique	(%)	Modé d'identification
01	Tricyclene	919	927	1016	1012	MH	0,1	GC-RI, GC-MS
02	α -Pinene	931	936	1016	1025	MH	58,1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
03	Camphene	942	950	1064	1068	MH	1,3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
04	Thuja-2,4(10)-diene	945	945	1126	1122	MH	0,7	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
05	β -Pinene	964	978	1111	1110	MH	tr	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
06	Myrcene	969	987	1160	1161	MH	1.5	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
07	<i>p</i> -Cymene	1011	1015	1270	1270	MH	0.3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
08	Limonene*	1020	1025	1201	1198	MH	1.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
09	β -Phellandrene*	1020	1023	1210	1209	MH	0.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
10	<i>p</i> -Cymenene	1071	1075	1437	1437	MH	0.2	GC-RI, GC-MS
11	α -Campholenal	1103	1106	1490	1496	MO	0.8	GC-RI, GC-MS
12	<i>trans</i> -Pinocarveol	1122	1126	1652	1661	MO	1.0	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
13	<i>trans</i> -Verbenol	1127	1136	1675	1680	MO	0.6	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
14	<i>cis</i> -verbenol	1128	1128	1660	1676	MO	0,3	GC-RI, ¹³ C-NMR
15	Pinocarvone	1139	1137	1567	1575	MO	0.2	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
16	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1144	1127	1724	1674	MO	0.4	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
17	Borneol	1149	1150	1697	1699	MO	0.1	GC-RI, GC-MS
18	Terpinen-4-ol	1160	1164	1599	1601	MO	tr	GC-RI, GC-MS
19	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1158	1159 ^a	1864	1848	MO	0.1	GC-RI, GC-MS

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

20	Myrtenal	1168	1172	1626	1631	MO	0.5	GC-RI, GC-MS
21	α -Terpineol	1171	1176	1694	1694	MO	0.2	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
22	Myrtenol	1177	1178	1788	1790	MO	0.3	GC-RI, ¹³ C-NMR
23	Verbenone	1179	1183	1705	1720	MO	0.3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
24	<i>trans</i> -Carveol	1196	1200	1831	1836	MO	0.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
25	Bornylacetate	1268	1268 ^b	1577	1573 ^b	MO	0.3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
26	α -copaene	1374	1375	1488	1491 ^c	SH	0.2	GC-RI, ¹³ C-NMR
27	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1415	1421	1592	1598	SH	4.2	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
28	(<i>E</i>)- β -Farnesene	1446	1446	1663	1664	SH	0.4	GC-RI, GC-MS
29	α -Humulene	1448	1455	1663	1667	SH	0.7	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
30	4-épi-cubébol	1458	n.i.	n.i.	n.i.	SO	0.1	GC-RI, GC-MS
31	d-Cadinene	1512	1520	1750	1756	SH	0.2	GC-RI, GC-MS
32	Caryophylleneoxide	1567	1578	1975	1986	SO	3.3	GC-RI, GC-MS
33	HumuleneepoxideII	1591	1602	2031	2047	SO	0.5	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
34	Manoyloxyde	1958	n.i.	n.i.	n.i.	SO	0.3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
35	Abietatriène	2035	2039	2479	2503	DH	2.3	GC-RI, GC-MS
36	Abietadiene	2067	2071	2454	2450	DH	1.7	GC-RI, MS, ¹³ C-NMR
37	Labda-8(17)-13(Z)-Dien-15-al	2188	n.i.	n.i.	n.i.	DO	0.6	GC-RI, ¹³ C-NMR
38	Labda-8(17)-13(E)-Dien-15-al	2200	n.i.	n.i.	n.i.	DO	0.7	GC-RI, ¹³ C-NMR
39	Dehydroabietal	2217	2219 ^d	n.i.	n.i.	DO	1.7	GC-RI, ¹³ C-NMR

Ordre d'élution est donné sur colonne apolaire, excepté ceux marqués d'un* (colonne polaire);

RIa, RIp: indices de rétention sur colonne apolaire et polaire, respectivement; RIa (lit), RIp (lit), indices de rétention de la littérature;

MS, Spectrométrie de masse; NMR, Résonance Magnétique Nucléaire; tr, traces; n.i.: non identifié; M.H.: Monoterpènes hydrocarbonés;

M.O.: Monoterpènes Oxygénés; S.H.: Sesquiterpènes hydrocarbonés; S.O.: Sesquiterpène Oxygénés; D.H.: Diterpènes Hydrocarbonés; D.O.: Diterpènes Oxygénés.

Les valeurs de RIa/RIa(lit) et RIp/RIp(lit) suivies des lettres (a-d) sont obtenues à partir des références suivantes (**Duquesnoy et al., 2006; Bousmaha et al., 2006; Blanc et al., 2006 ; Nam et al., 2015**).

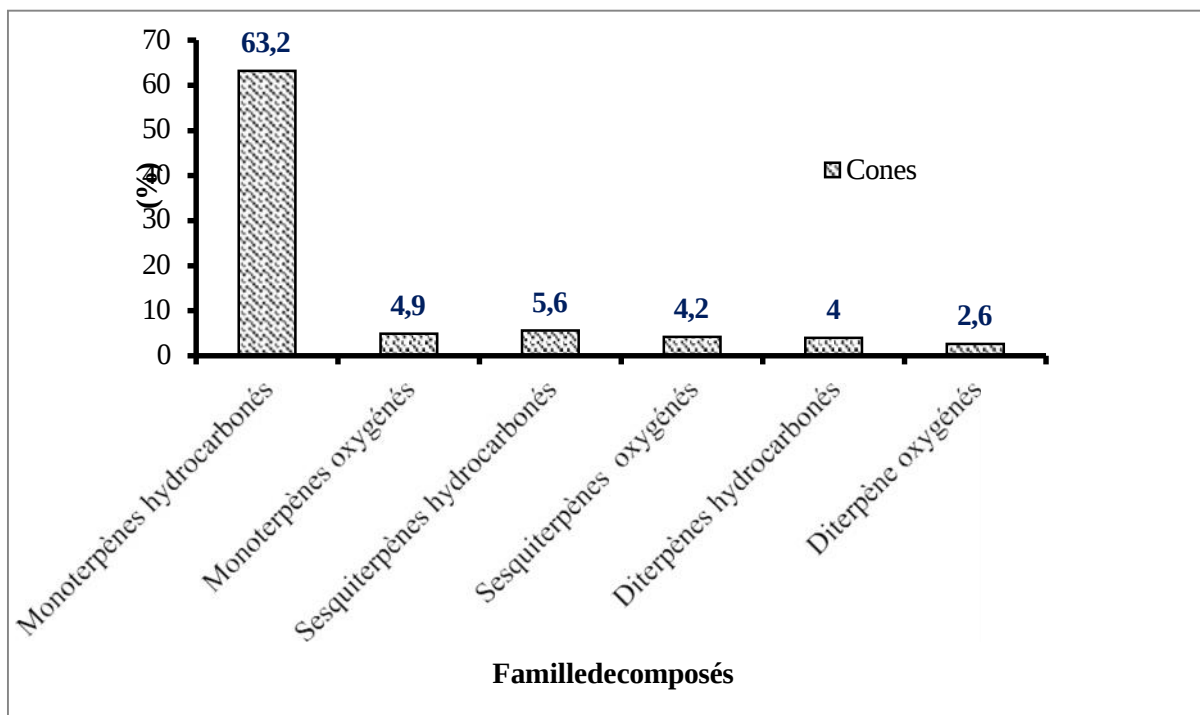


Figure 34: Diversité des familles de molécules présentes dans les HEs des cônes de *P. nigra*.

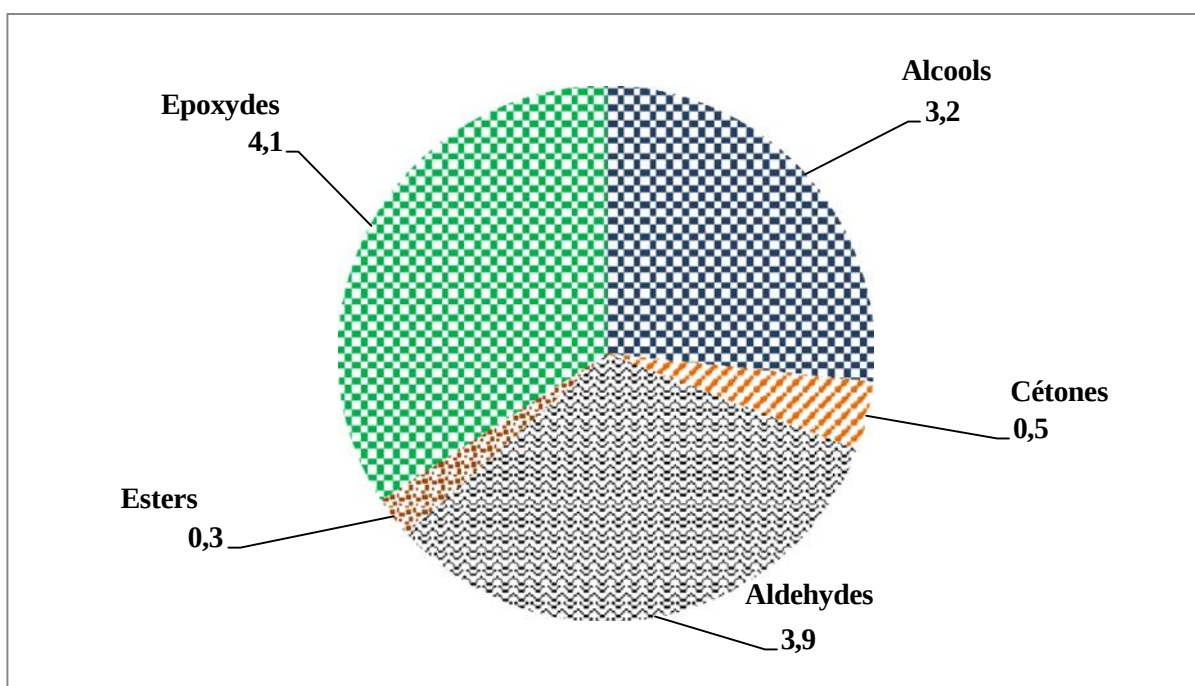


Figure 35: Diversité (%) des groupements fonctionnels des composés oxygénés présents dans les HEs des cônes de *P. nigra*

En général, et sans tenir compte des composés non identifiés, l'analyse de la composition chimique a montré que l' α -pinène (58.1 %), le (*E*)- β -caryophyllène (4.2 %), le caryophyllène oxyde (3.3 %) et l'abiatatriène (2.3 %) constituaient les composés majoritaires des HEs des cônes de *P. nigra*. Il convient de noter la présence de divers composants mineurs portant le squelette du pinane : β -pinène, α -campholénal, *trans*-pinocarvéol, *trans*-verbénol, *cis*-verbénol, pinocarvone, bornéol, terpinène-4-ol, myrténal, α -terpinéol et myrténol. En effet, un certain nombre de constituants communs sont retrouvés de façon quasi-constante dans les HEs des cônes des différentes sous-espèces de *P. nigra*. Il s'agit de l' α -pinène, le sabinène, le β -pinène, le β -caryophyllène, le caryophyllène oxyde, qui sont largement décrites dans la littérature (Bader et al., 2000; Macchioni et al., 2003; Tumen et al., 2010; Amri et al., 2022), mais chaque huile essentielle est caractérisée par un constituant spécifique, bien souvent largement majoritaire. En revanche, d'autres composés tels le β -phellandrene, le limonène, l'acétate de bornyl, le germacrene D et l'abietadiène sont identifiés soit, en tant que composés minoritaires ou retrouvés en traces dans les cônes, soit inféodés à d'autres organes ou à d'autres espèces du genre *Pinus* (Tumen et al., 2010; Yan et al., 2010^b; Nam et al., 2014; Li et al., 2019 ; Khouja et al., 2020 ; Khedhri et al., 2022 ; Amri et al., 2022).

Il est indispensable de confronter les conclusions de cette analyse avec les résultats obtenus par d'autres chercheurs pour une meilleure compréhension du chémotype des huiles essentielles de cette partie de la plante. La composition de l'huile extraite des cônes de *P. nigra* (Tableau 9) présentait des similitudes qualitatives limitées avec celle décrite en Sicile (Italie) pour les cônes de *P. laricio*, mais révélait quelques différences quantitatives. Les constituants prédominants de ces huiles étaient principalement l' α -pinène (68,6 %) et le β -caryophyllène (9,1%) (Bader et al., 2000). D'autre part, les cônes de *P. nigra*, de provenance italienne (Pian della Fioba, Massa) (Macchioni et al., 2003), ont comme constituant principal l' α -pinène (49.5%) suivi du sandaracopimaradiène (4,8%), totalement absent dans les HEs des cônes de *P. nigra* du Djurdjura. Ce résultat corrobore avec celui obtenu dans notre étude, notamment avec la teneur élevée en α -pinène, seulement la présence du sandaracopimaradiène (espèce italienne) et l'absence d'(*E*)- β -caryophyllène, du caryophyllène oxyde et de l'abiatatriène (présente étude) font la différence, mais cette différence peut être reliée aux conditions pédoclimatiques des deux pays, aux conditions d'extraction, la période de collecte et le stade de développement de la plante (l'âge de l'organe). De même, en Turquie, les HEs des cônes *P. nigra* (Tumen et al., 2010) présentaient une composition chimique très proche de celle identifiée dans le présent travail. Elle est caractérisée par la prédominance de l' α -pinène

(45.36%), le caryophyllène oxyde (8.05 %), le β -caryophyllène (6.73 %), le 18-norabieta-8, 11,13-triène (3.42%) et de hydroabietal (3.33%). À l'exception du 18-norabieta-8, 11,13-triène, non identifié dans les essences de *P. nigra* de Djurdjura, des différences quantitatives ont été enregistrées pour les autres molécules majoritaires ayant défini le chémotype des HES des cônes de *P. nigra* de la Turquie. De plus, pour la sous-espèce *laricio* acclimatée en Tunisie (Amri et al., 2022), les HES extraites des cônes ont montré une composition chimique différente de celle obtenue pour la sous-espèce *mauretanica* de Djurdjura. Les constituants prédominants de ces huiles étaient principalement l' α -pinène (34.52 %), le limonène (10.86 %), le β -caryophyllène (6.26%) et le caryophyllène oxyde (5.96%). Bien que d'autres composants tels que le p-Menth-1,5-diène-8-ol (2.21 %), le (Z)-pinocarvéol (1.82 %) et l' α -campholénal (1.22 %) étaient présents en faible quantité. Les essences des cônes des deux sous-espèces présentaient, d'une part, des différences quantitatives pour les constituants suivants: α -pinène (58.1%-Djurdjura / 34.52 %-Tunisie), le limonène (1.1 %-Djurdjura / 10.86 %-Tunisie), β -caryophyllène (4.2 %-Djurdjura / 6.26 %-Tunisie), caryophyllène oxyde (3.3 %-Djurdjura / 5.96 %-Tunisie) et d'autre part, des différences qualitatives par rapport à la présence et/ou à l'absence de certaines molécules dans les profils chimiques des deux sous-espèces. La différence (variation) de composition constatée entre les HES des cônes de *P. nigra* sp. *mauretanica* et celles rapportées par d'autres auteurs, pour les autres sous-espèces, est vraisemblablement liée à la régulation différentielle des divers constituants de l'huile essentielle par des facteurs abiotiques et biotiques. De nombreux facteurs écologiques tels que la température, l'humidité relative, l'insolation et la nature du sol peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles.

En raison de la distribution restreinte, du statut écologique et des stratégies de préservation appliquées, peu de recherches phytochimiques ont été menées sur *P. nigra* sp. *mauretanica* de Djurdjura. Cette étude est la première à décrire la présence et la composition chimique des huiles essentielles de cette espèce en Algérie. En effet, c'est une espèce extrêmement rare, dont la présence est confinée uniquement à l'Algérie et au Maroc. Il est crucial de comparer les conclusions de cette analyse avec les résultats obtenus par d'autres scientifiques pour une meilleure compréhension du chémotype des huiles essentielles de cette partie de la plante (les cônes). Les principaux résultats rapportés dans la littérature pour différents pays et différentes espèces sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Diversité des schémo-types (composés majoritaires) isolés des HES des cônes de différentes espèces de genre *Pinus*

Espèce ou sous-espèce	Origine (Pays, région)	Chémotype (composés majoritaires)	Auteur(s)
<i>P. laricio</i>	Italie (Sicile)	α -pinène (68.6%), β -caryophyllène (9.1 %)	Bader et al., 2000
<i>P. pinea</i>	Italie (Pian della Fioba, Massa)	limonène (61.6%), α -pinène (19.4%), β -caryophyllène (2.8 %).	Macchioni et al., 2003
<i>P. halepensis</i>		α -pinène (53.6%), myrcène (13.7%), β -caryophyllène (6.7 %), caryophyllène oxyde (2.3 %).	
<i>P. pinaster</i>		β -pinène (29.2%), α -pinène (24.7%), longifolène (20.8%), myrcène (4.2 %).	
<i>P. nigra</i>		α -pinène (49.5%), sandaracopimaradiène (4.8 %).	
<i>P. rigida</i>	Japon (Tama Forestry Science)	β -phellandrène (15.0%), pinocarvéol (7.6%), α -terpinéol (7.4%), α -pinène (6.5%), myrténol (6.1 %), β -pinène (6.0 %).	Kurose et al., 2007
<i>P. taeda</i>		α -pinène (51.8%), p-mentha-1,5-diène-8-ol (4.8 %), verbénone (4.8%), pinocarvéol (4.5 %), β -pinène (3.8%), bornéol (3.8 %)	

<i>P. densiflora</i>	Garden, Takao)	Germacrene D (20.6 %), β -caryophyllène(8.9%), δ -cadinène (8.4%),longifolène(8.0%)	
<i>P. koraiensis</i>	Corée du Sud (Province de Gyeonggi)	limonène (27.90 %), α -pinène (23.89%), β -pinène(12,02%),3-carène(4.95%), β -myrcène(4.53%), isolongifolène (3.35 %), acétate (-)-bornyle (2.02 %), caryophyllène (1.71%)camphène(1.54 %).	Lee et al., 2008
<i>P. brutia</i>	Lebon	α -pinène(40.70 %), β -pinène (28.27%)et δ -3-carène(13.36%).	Loizzo et al., 2008
<i>P. koraiensis</i>	Chine (province de Heilongjiang)	α -pinène (35.2 %), limonène (18.4%), β -pinène (8.7 %), β -caryophyllène(3.5%),myrcène (3.0%).	Yan et al., 2010 ^a
<i>P. sylvestris</i>		aromadendrene (20,2 %), α -pinène (18,5%), α -longipinène(10,5%), α -terpinéol(5,5%)	
<i>P. armandii</i>	Chine	Par hydrodistillation : α -pinène (20,92%),D-limonène(15,78%), β -pinène(4. 91%), transpinocarveol (4,76%). Par SPME : α -pinène (41,59%), le D-limonène(17,8%), β -caryophyllène (11,02%), β -pinène(7,54%).	Yan et al., 2010 ^b
<i>P. nigra</i>		α -pinène(45.36%),caryophyllène oxyde (8.05 %), β -caryophyllène (6.73 %), 18-norabieta-8, 11,13-	

<i>P. sylvestris</i>		triene(3.42%),dehydroabietal (3.33%).	
<i>P. brutia</i>	Turquie(3 localités : Gokova, Bartin et Izmir)	18-norabieta-8,11,13-triene (15.78%), α -pinène(14.76%), caryophyllèneoxyde(12.58%), dehydroabietal(7.12%),abieta-8,11,13-triene (5.20 %)	Tumenetal., 2010
<i>P. pinea</i>		β -pinène (39.56 %), α -pinène (30.91%), Δ^3 -carene(7.8%), β -caryophyllène(5.01%).	
<i>P. halepensis</i>		limonene + β -phyllandrene (69.54%), α -pinène(30.91%), α -pinène(30.91%),b-myrcene, β -caryophyllène (6.73 %), caryophyllène oxyde (8.05 %)	
<i>P. roxburghii</i>	Nepal (Biratnagar)	<i>E</i> -caryophyllène(26,8%),terpinène-4-ol(16,2%), δ -3-carène(6,8%)et d' α -humulène (5,0 %).	Satyaletal., 2013
<i>P. halepensis</i>	France(3site en Corse: (Saleccia,Tre Padulede Suartoneet Capodi Feno)	α -Pinène(47,5%),myrcène(11,0%), (<i>E</i>)- β -caryophyllène(8,3%),oxyde decaryophyllène (5,9%).	Nametal.,2014

<i>P. ponderosa</i>	France (Corse)	α -pinène(53.6%), sabinène(13.5%) limonène(9.8%), β -pinène(9.3 %).	Garcia et al., 2017
<i>P. mugo</i>	Pologne (station expérimentale forestière, Arboretum de l'université agricole de Varsovie à Rogow)	(<i>E</i>)- β -caryophyllène(24,0%), 3- carène(19,2%), myrcène(16,5%).	Liset et al., 2019
<i>P. halepensis</i> (arbres adultes âgés de 54 ans)	Tunis (Arboretum de Henchir Naam, nord- ouest de la Tunisie).	Cônes immatures : α -pinène (46.1%), β -myrcène (19.8 %), β - caryophyllène (11.4 %), β - caryophyllène oxyde (6.1 %), sclareol(3.4%), abiatadiène(1.2%). Cônes matures : β -caryophyllène oxyde(32.4%), α -pinène(30.6%), β - caryophyllène(8.6%), β -myrcène (5.6 %), humulène oxyde (4.5 %), abiatadiène(4.2%), sclareol(1.6%).	Khouja et al., 2020
<i>P. pinaster</i>		β -pinène (33.12 %), α -pinène (29.1%), longifolène(13.9%), β - myrcène(4.9%), limonène(3.8%).	Khedhri et al., 2022
<i>P. pinea</i>		limonène (46.56%), α -pinène(28.15%), β -caryophyllène (4.27%), Caryophyllène oxyde (3.92).	

<i>P. brutia</i>		α -pinene(32.15%), β -pinene (9.34%), longifolene(8.09%), β -thujone(4.56%), β -caryophyllene (3.56%), camphor(3.47%), viridiflorol(3.47%), caryophyllene oxide(2.74).	Amri et al., 2022
<i>P. nigra</i> sp. <i>laricio</i>		α -pinene(34.52%), limonene (10.86%), β -caryophyllene(6.26%), caryophyllene oxide (5.96%), <i>p</i> -menth- 1,5-dien-8-ol (2.21%).	

D'après les résultats des analyses de la composition chimique des huiles essentielles des espèces étudiées présentées dans le tableau ci-dessous, on peut dire que chaque espèce a présenté une composition et un chémotype bien spécifiques. La majorité de ces études ont confirmé la richesse des huiles essentielles de ces espèces en α -pinène. Ainsi, d'une manière générale, nos résultats sont en accord avec la littérature, mais quelques différences (qualitatives et quantitatives) peuvent être reliées à différents facteurs, notamment l'origine géographique (différents pays, différents sites, différentes régions), la méthode d'extraction (HD / SPME), l'âge de la plante (arbres adultes âgés de 54 ans), la maturité de l'organe étudié (cônes immatures / cônes matures), présence de sous-espèce (*laricio* et *nigra*) et d'espèces de même genre.

I.3.2. *Abies numidica*

Les huiles essentielles des aiguilles, des branches et des cônes d'*A. numidica* de djebel Tababort ont été obtenues par hydrodistillation et analysées par combinaison de la CPG, CPG/SM et de la RMN du ^{13}C . Le **tableau 10** illustre les composés identifiés par GC-MS, présentés dans l'ordre de leur élution, ainsi que leurs indices de rétention sur les deux colonnes capillaires employées.

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

Tableau 10 : Composition chimique des HES des différentes parties de *Abies numidica* De Lannoy ex Carrière (Pinaceae) de djebel Tababourt

N°	Compound	RI _a	RI _a (lit)	RI _p	RI _p (lit)	Class	Content(%)			Identification mode
							NEO	TEO	CEO	
01	Santene	878	884	979	984 ^a	MH	1.8	0.1	tr	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
02	Tricyclene	921	927	1015	1012	MH	1.8	0.2	tr	GC-RI, GC-MS
03	α-Thujene	924	932	1015	1026	MH	0.1	0.1	tr	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
04	α-Pinene	932	936	1015	1025	MH	17.6	59.7	25.3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
05	α-Fenchene	941	941	1054	1061	MH	-	-	tr	GC-RI, GC-MS
06	Camphene	945	950	1065	1068	MH	10.9	1.0	0.4	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
07	Thuja-2,4(10)-diene	946	945	1126	1122	MH	-	0.3	0.8	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
08	Heptan-1-ol	955	959 ^b	1445	1452	Other	-	-	0.0	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
09	Sabinene	966	973	1122	1122	MH	0.1	0.4	0.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
10	β-Pinene	971	978	1111	1110	MH	6.8	12.9	5.6	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
11	Myrcene	982	987	1160	1161	MH	0.3	0.6	0.9	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
12	α-Phellandrene	998	1002	1165	1168	MH	tr	-	-	GC-RI, GC-MS
13	p-Cymene	1011	1015	1271	1270	MH	0.1	0.2	0.4	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
14	Limonene*	1021	1025	1203	1198	MH	2.1	10.0	40.7	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
15	β-Phellandrene*	1021	1023	1210	1209	MH	4.5	0.4	0.3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
16	p-Cymenene	1072	1075	1437	1437	MH	-	0.1	0.4	GC-RI, GC-MS
17	Terpinolene	1079	1082	1282	1282	MH	0.2	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

18	Nonanal	1082	1083	1393	1391	other	0.1	0.1	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
19	Linalool	1084	1086	1546	1543	MO	0.2	-	-	GC-RI,GC-MS
20	Fenchol	1098	1099 ^c	1580	1582 ^c	MO	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
21	α -Campholenal	1105	1106	1488	1496	MO	0.1	0.3	1.0	GC-RI,GC-MS
22	Nopinone	1106	1108 ^d	1577	1577 ^d	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
23	<i>cisp</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	1115	1117	1660	1652	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
24	Camphor	1119	1125	1515	1515	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
25	<i>trans</i> -Pinocarveol	1122	1126	1652	1661	MO	-	0.5	2.7	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
26	<i>trans</i> -Verbenol	1127	1136	1675	1680	MO	-	0.1	0.7	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
27	Pinocarvone	1137	1137	1567	1575	MO	-	0.3	1.3	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
28	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1144	1127	1724	1674	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
29	Borneol	1157	1150	1697	1699	MO	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS
30	Terpinen-4-ol	1158	1164	1591	1601	MO	0.2	-	0.5	GC-RI,GC-MS
31	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1160	1159 ^e	1794	1848	MO	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS
32	Myrtenal	1168	1172	1626	1631	MO	-	0.3	1.3	GC-RI,GC-MS
33	α -Terpineol	1172	1176	1693	1694	MO	0.2	0.1	1.0	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
34	Myrtenol	1177	1178	1788	1790	MO	-	0.1	0.8	GC-RI, ¹³ C-NMR
35	Verbenone	1179	1183	1705	1720	MO	-	0.1	3.0	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
36	<i>trans</i> -Carveol	1196	1200	1832	1836	MO	-	0.1	0.9	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
37	<i>cis</i> -Carveol	1207	1210	1862	1854	MO	-	-	0.3	RI, ¹³ C-NMR

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

38	Carvone	1213	1214	1732	1733	MO	-	0.1	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
39	Carvotanacetone	1218	1220	1684	1687	MO	-	-	tr	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
40	Linalylacetate	1240	1236 ^a	1555	1551	MO	0.2	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
41	Perillaldehyde	1247	1242 ^f	1783	1779 ^f	MO	-	-	tr	GC-RI, ¹³ C-NMR
42	Phellandral	1249	1252 ^g	1712	1715 ^g	MO	-	-	tr	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
43	Bornyl acetate	1268	1268 ^c	1577	1573 ^c	MO	0.2	-	0.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
44	Carvacrol	1278	1278	2221	2210	MO	-	-	tr	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
45	α -Terpinylacetate	1332	1335	1693	1694	MO	0.1	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
46	Citronellyl acetate	1334	1337	1659	1656	MO	0.1	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
47	α -Cubebene	1347	1355	1454	1460	SH	0.4	0.1	-	GC-RI, GC-MS
48	α -Longipinene	1350	1360	1479	1469	SH	2.4	0.5	0.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
49	Longicyclene	1375	1382	1488	1489	SH	0.5	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
50	β -Bourbonene	1382	1386	1515	1523	SH	-	-	0.1	GC-RI, GC-MS
51	Longifolene	1404	1411	1563	1577	SH	1.6	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
52	β -Longipinene	1415	1403	n.i.	n.i.	SH	-	-	0.2	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
53	(E)- β -Caryophyllene	1417	1421	1592	1598	SH	6.5	1.0	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
54	Himachala-2,4-diene	1421	1430 ^h	1598	1611 ^h	SH	5.9	0.6	0.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
55	β -Copaene	1426	1430	1586	1579	SH	0.1	-	-	GC-RI, GC-MS
56	α -Himachalene	1445	1450	1636	1663	SH	1.1	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
57	α -Humulene	1449	1455	1664	1667	SH	2.2	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
58	(E)- β -Farnesene	1457	1446	1666	1664	SH	0.2	-	-	GC-RI, GC-MS

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

59	g-Muurolene	1463	1474	1682	1690	SH	0.8	0.4	0.3	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
60	g-Himachalene	1469	1479	1702	1708	SH	0.6	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
61	Germacrene D	1476	1479	1709	1708	SH	-	0.2	1.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
62	g-Humulene	1485	1483	1724	1716 ^a	SH	0.8	-	0.1	GC-RI, ¹³ C-NMR
63	α-Muurolene	1490	1496	1721	1723	SH	0.2	-	-	GC-RI, GC-MS
64	d-Selinene	1491	1490	n.i.	1728 ^z	SH	-	-	0.1	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
65	g-Cadinene	1504	1507	1750	1763	SH	1.2	0.6	0.2	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
66	b-Himachalene	1505	1500	1715	1723	SH	2.8	-	-	GC-RI, GC-MS
67	<i>trans</i> -Calamenene	1508	1517	1826	1823	SH	0.4	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
68	d-Cadinene	1514	1520	1751	1756	SH	5.0	0.9	0.3	GC-RI, GC-MS
69	<i>ar</i> -Himachalene	1522	1528	1715	n.i.	SH	0.4	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
70	α-Calacorene	1527	1527	1908	1921	SH	0.1	-	-	GC-RI, GC-M
71	α-Cadinene	1529	1534	1785	1769	SH	0.1	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
72	b-Calacorene	1547	1541	1934	1940	SH	0.3	-	-	GC-RI, GC-M
73	Caryophyllene oxide	1568	1578	1975	1986	SO	0.8	0.4	-	GC-RI, GC-MS
74	Longiborneol	1583	1597	2057	2157	SO	0.8	0.2	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
75	Humulene epoxide II	1592	1602	2036	2047	SO	0.2	0.1	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
76	τ-Cadinol	1624	1633	2162	2169 ^a	SO	1.2	-	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR
77	t-Muurolol	1631	1628 ⁱ	2177	2179 ⁱ	SO	-	0.2	-	GC-RI, GC-MS, ¹³ C-NMR

Analyse physico-chimique des huiles essentielles

78	Himachalol	1632	1647 ^j	2223	2135 ^j	SO	1.3	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
79	α -Cadinol	1636	1643	2223	2227	SO	0.4	-	-	GC-RI, MS, ¹³ C-NMR
80	Dehydroabietal	2030	2219 ^j	n.i.	n.i.	DO	-	0.3	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
81	Abietadiene	2085	2071	2478	2450	DH	-	0.2	-	GC-RI, MS, ¹³ C-NMR

Ordre d'élution est donné sur colonne apolaire, excepté ceux marqués d'un* (colonne polaire);

RIa, RIp: indices de rétention sur colonne apolaire et polaire, respectivement; RIa(lit), RIp(lit), indices de rétention de la littérature;

MS, Spectrométrie de masse ; NMR, Résonance Magnétique Nucléaire; tr, traces ; n.i: non identifié ; M.H : Monoterpènes hydrocarbonés; M.O.: Monoterpènes Oxygénés; S.H.: Sesquiterpènes hydrocarbonés ; S.O.: Sesquiterpène Oxygénés; D.H: Diterpènes Hydrocarbonés ; D.O. : Diterpènes Oxygénés

Les valeurs de RIa/ RIa(lit) et RIp / RIp(lit) suivies des lettres (a-j) sont obtenues à partir des références suivantes ([Duquesnoy et al., 2007](#) ; [Babushok et al., 2011](#) ; [Duquesnoy et al., 2006](#); [Bousmaha et al., 2006](#); [Blancet al., 2006](#) ; [Botiet al., 2006](#); [Gonny et al., 2006](#); [Duquesnoy et al., 2010](#); [Thaie et al., 2019](#); [Nam et al., 2015](#)) et la référence^(*) [Type de colonne: Packed; phase active: Carbowax 20M; Température (°C) : 165] : [Andersen and Falcone \(1969\)](#)

L'analyse a permis d'identifier 38, 49 et 50 composés dans les HEs extraites, respectivement, des cônes, des rameaux et des aiguilles, représentant 93,5 %, 93,8 % et de 86,0 % de la totalité de l'HE. Il est à noter que la composition des HEs de ces parties de la plante présente des variations, tant sur le plan qualitatif que quantitatif. La classification des composés a révélé la richesse de ces huiles en monoterpènes hydrocarbonés (74.9% pour les cônes, 86% pour les branches et 46.3% pour les aiguilles) et sesquiterpènes hydrocarbonés (2.6% pour les cônes, 33.6% pour les branches et 4.3 % pour les aiguilles) (**Figure 36**).

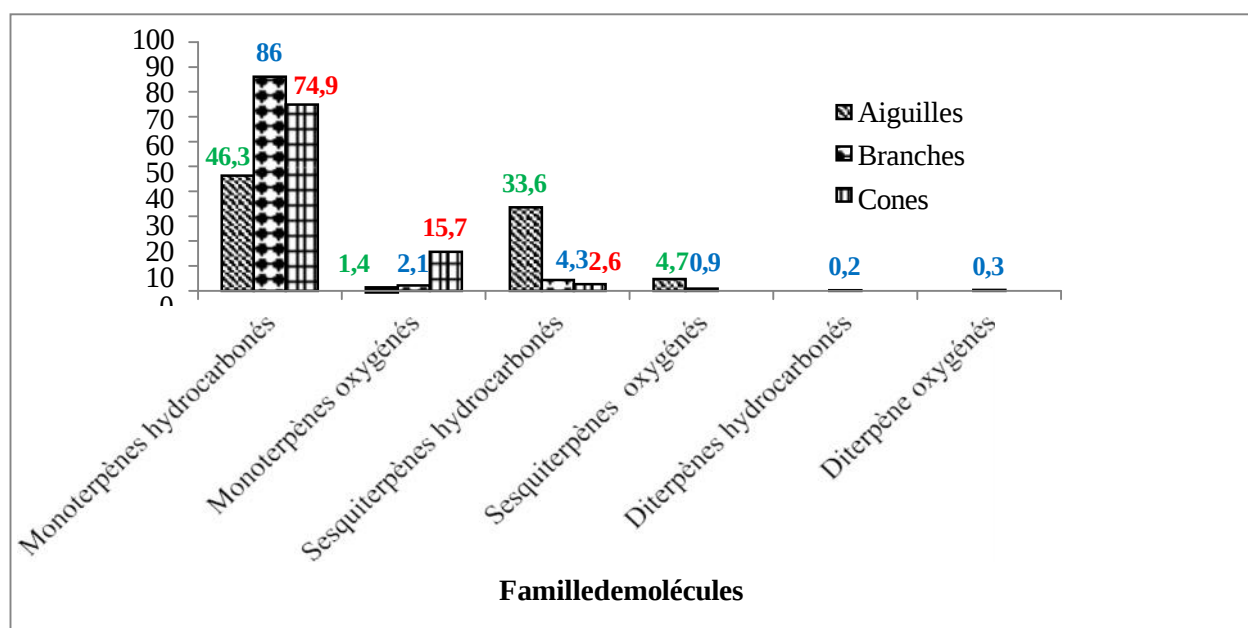


Figure 36: Répartition des familles de molécules présentes dans les HEs des différentes parties d'*A. numidica*.

En général, les monoterpènes hydrocarbonés constituent les composés majeurs des trois parties de la plante (**Figure 37**), en particulier l' α -pinène (25.3% pour les cônes, 59.7% pour les branches et 17.6% pour les aiguilles), son isomère le β -pinène (5.6% pour les cônes, 12.9% pour les branches et 6.8 % pour les aiguilles) et le limonène (40.7 % pour les cônes, 10 % pour les branches et 2.1 % pour les aiguilles).

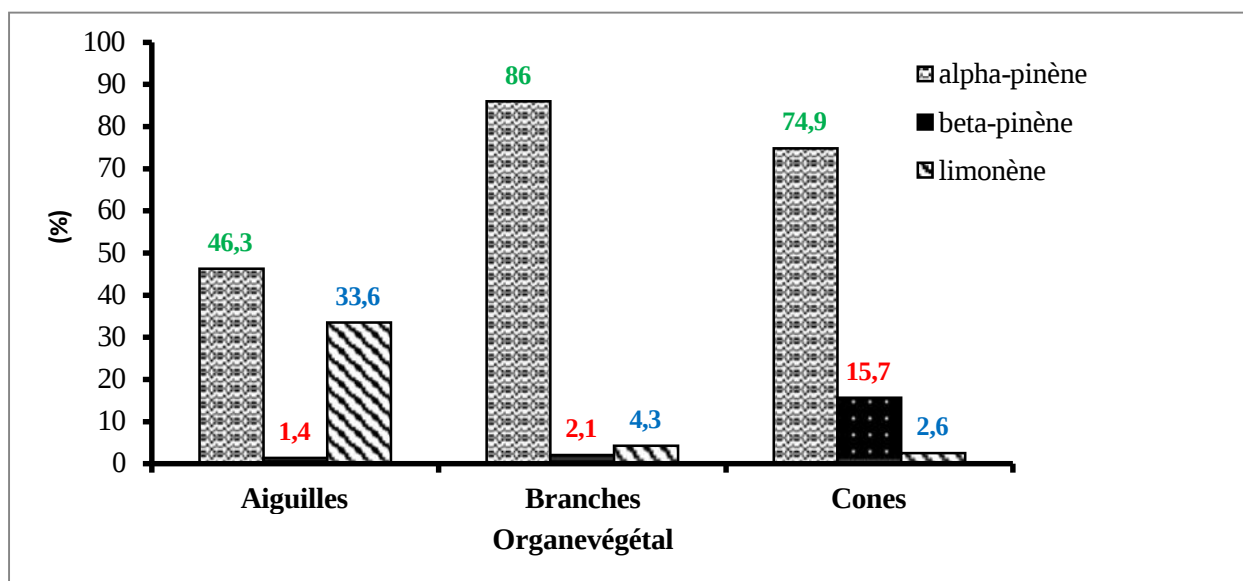


Figure 37: Diversité (%) des composés majeurs des HEs des différentes parties d'*A. numidica*

Ainsi, ces analyses ont montré la prédominance de composés hydrocarbonés avec une teneur combinée allant de 90,5 % pour les branches à 77,5 - 79,9 % pour les cônes et les aiguilles, respectivement. Les composés oxygénés (alcools, esters, aldéhydes, cétones, époxydes) quant à eux, ont été qualitativement et quantitativement peu identifiés dans les HEs des trois organes (Figure 38).

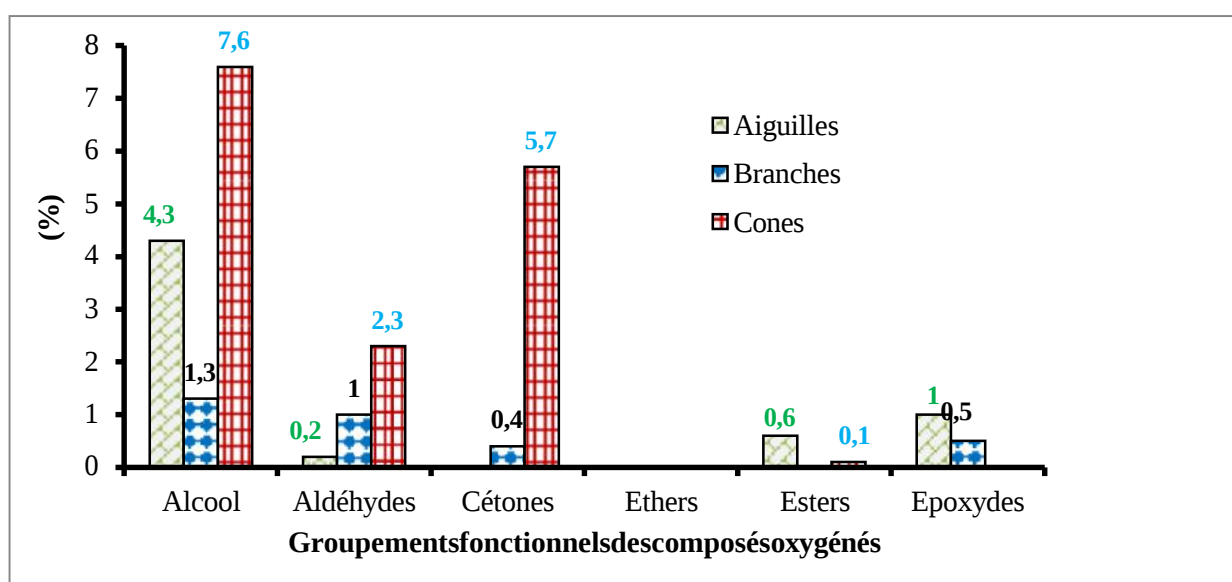


Figure 38: Diversité (%) des groupements fonctionnels des composés oxygénés des trois parties d'*A. numidica*

Ils constituaient une teneur combinée variant de 3,3 % dans les branches à 6,1 - 15,7 % dans

les aiguilles et les cônes, respectivement. En somme, seulement sept composants sont présents en quantité supérieure à 5 % : α -pinène (concentration maximale dans les branches : 59,7 %), limonène (concentration maximale dans les cônes : 40,7 %), β -pinène (concentration maximale dans les branches : 12,9 %), camphène (concentration maximale dans les aiguilles : 10,9 %), (E)- β -Caryophyllène (concentration maximale dans les aiguilles : 6,5 %), himachala-2,4-diène (concentration maximale dans les aiguilles : 5,9 %) et δ -cadinène (concentration maximale dans les aiguilles : 5,0 %). Cependant, malgré le travail d'analyse réalisé, il reste encore un certain nombre de composés non identifiés.

Les résultats de cette étude sont similaires à ceux obtenus par [Ramdani et al., \(2014\)](#) sur les HE extraites de l'apariea aérienne d'*A. numidica* des monts Babors. Comme précédemment illustré (**Tableau 10**), l'HE des aiguilles était principalement composée d' α -pinène (22,6 %), de limonène (19,7 %), de β -pinène (12,3 %), de camphène (11,2 %) et de β -phellandrène (7,8 %). Cependant, notre échantillon ne contenait qu'une faible quantité de limonène (2,1 %). Une étude antérieure réalisée par [Tlili-Ait Kaki et al., \(2013\)](#) a révélé que l'HE extraite des aiguilles d'*A. numidica* (recueillies à Seraïdi, Annaba) contenait de l'acétate de bornyle (29,62 %), du camphène (23,97 %) et de l' α -pinène (13,17 %) en tant que constituants majeurs. Récemment, [Benouchenne et al., \(2022\)](#) ont étudié la composition chimique des huiles essentielles des aiguilles d'*A. numidica* (recueillies à djebel Ouahch, Constantine) et ont montré que les principaux constituants volatils étaient le caryophyllène (17,31 %), l' α -pinène (10,58 %), le 2,2,6,10-Tétraméthylbicyclo[5.4.0]undéca-9,11-diène (8,65 %), l'acétate de linalyle (7,41 %), le β -silinène (7,28 %) et le sabinène (6,88 %). Les résultats de ces deux dernières études ont plutôt montré l'existence de nouveaux chémotypes différents de ceux des populations naturelles (Babor et Tababort) qui seraient probablement une expression génétique de l'adaptation de l'espèce aux conditions pédoclimatiques qui régnaient dans les régions où l'espèce est acclimatée. En outre, [Bağcı & Babaç \(2003\)](#) ont démontré que les composés majeurs peuvent être les mêmes, mais avec quelques différences quantitatives dans diverses sous-espèces d'*Abies* poussant en Turquie. Il est important de souligner que l'acétate de bornyle est un composant courant dans diverses huiles de conifères ([Burdock, 2016](#)). De plus, il a été identifié comme l'un des constituants majeurs des huiles essentielles de plusieurs espèces d'*Abies*, dont *A. alba* ([Yang et al., 2009](#)), *A. sachalinensis* ([Laakso & Hiltunen, 1994](#)), *A. sibirica* ([Gerling et al., 2018](#)), *A. arnoldiana* ([Koedam et al., 1980](#)) et *A. koreana* ([Baran et al., 2007](#); [Oh et al., 2007](#)). Dans leur étude sur *A. sibirica*, [Gerling et al., \(2018\)](#) ont constaté que l'acétate de bornyle était le composant le plus abondant, représentant 29,4 %, suivi du camphène (28,8 %), de l' α -pinène (10,8 %) et du 5-3-carène (6,2 %). Bien que ce composé ait été produit en quantités relativement plus faibles chez *A. numidica*, le profil

(composition) de terpènes semblable à celle d'autres espèces d'*Abies*. Ce phénomène de constance qualitative des principaux composants à travers plusieurs espèces d'*Abies* a été souligné par plusieurs chercheurs. Plus spécifiquement, il a été observé que certains monoterpènes, tels que le limonène, l' α -pinène, le camphène, le β -phellandène et le β -pinène, sont les composés les plus distinctifs au sein des espèces d'*Abies* (Schicchi et al., 2017). Il est important de souligner que les variations dans la composition chimique et les pourcentages totaux de ces composants doivent être considérées dans le contexte de la chimiodiversité. En effet, même au sein d'une même espèce, des différences significatives dans la composition des huiles essentielles peuvent survenir en fonction de divers facteurs tels que les conditions climatiques et du sol. Pour illustrer ce point, Gerling et al. (2018) ont constaté une cohérence dans le rendement moyen mensuel des HES d'*Abies sibirica*, mais des variations qualitatives ont été notées tout au long de l'année. Neubeller (1990) a indiqué que le β -pinène, l' α -pinène et le limonène étaient les principaux composants des huiles essentielles d'*A. alba* et d'*A. numidica*. Nonobstant la proximité génétique entre *A. alba* et *A. numidica* (Sanchez-Robles et al., 2014), il n'est pas approprié à ce stade de considérer ces informations comme des indicateurs chimiotaxonomiques pour suggérer des similitudes relatives. Par contre, dans l'analyse des aiguilles d'*A. alba* réalisée par Zeneli et al. (2001), l' α -pinène, le camphène, le β -pinène, le limonène et l'acétate de bornyle étaient les composants principaux. Comme démontré pour *A. alba*, le changement d'habitat a entraîné une variation significative des quantités des principaux constituants de l'huile essentielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Amri I., Hanana M., Jamoussi B. and Hamrouni L. (2017). Essential oil of *Pinus nigra* JF Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3877-S3882.
2. Amri I., Khammassi M., Gargouri S., Hanana M., Jamoussi B., Hamrouni L. and Mabrouk Y. (2022). Tunisian Pine Essential Oils: Chemical Composition, Herbicidal and Antifungal Properties. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(3), 430-443.
3. Andersen N.H. & Falcone M.S. (1969). The identification of sesquiterpene hydrocarbons from gas-liquid chromatography retention data. *Journal of Chromatography A*, 44, 52-59.
4. Babushok V.I., Linstrom P.J. and Zenkevich I.G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40 (4), 043101-47.
5. Bader A., Flamini G., Cioni P. L. and Morelli I. (2000). Composition of the essential oils from leaves, branches and cones of *Pinus laricio* Poiret collected in Sicily, Italy. *Journal of Essential Oil Research*, 12(6), 672-674.
6. Bağcı E. & Babaç M.T. (2003). Amorphometric and chemosystematic study on the *Abies* Miller (Fir) species in Turkey. *Acta Botanica Gallica*, 150(3), 355-367, 2003.
7. Baran S., von Reuss S.H., König W.A. and Kalembe D. (2007). Composition of the essential oil of *Abies koreana* Wils. *Flavour and fragrance journal*, 22(1), 78-83.
8. Barra A. (2009). Factors affecting chemical variability of essential oils: A review of recent developments. *Natural product communications*, 4(8):1147–1154.
9. Benouchenne Dj., Bellil I., Bensouici Ch., Yilmaz M.A., Akkal S., Keskinaya H.B. and Khelifi D. (2022) GC-MS Chemical profile, antioxidant ability, antibacterial effect, α -glucosidase, α -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activity of Algerian Fir essential oil. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15 (2): 303 – 310.
10. Blanc M.C., Bradesi P., Goncalves M.J., Salgueiro L. and Casanova J. (2006). Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: Analysis by ^{13}C -NMR and antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 2, 324-332.
11. Bonesi M., Menichini F., Tundis R., Loizzo M.R., Conforti F., Passalacqua N.G., Statti G.A. and Menichini F. (2010). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(5), 622-628.

12. Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Koukoua G., N'Guessan T.Y., Costa J. and J. Casanova (2006). Combined analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR. *Comptes Rendus Chimie*, 9, 1, 164-168.
13. Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi, F. and Hakim Y. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technology*, (3), 37.
14. Bourkhiss M., Chaouch A., Ouhssine M., Bourkhiss B. & Rassam A. (2015). Étude physicochimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du plateau central marocain. *Les technologies de laboratoire*, 9(37).
15. Bousmaha L., Boti J.B., Bekkara F.A., Castola V. and Casanova J. (2006). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 2, 368-372.
16. Chizzola R. & Müllner K. (2021). Variability of volatiles in *Pinus cembra* L. within and between trees from a stand in the Salzburg Alps (Austria) as assessed by essential oil and SPME analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(2), 567-579.
17. Dogan G. & Bagci E. (2018). Chemical Composition of Essential Oil of *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Pinaceae) Twigs, From Different Regions of Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(2), 511-519.
18. Duquesnoy E., Dinh N.H., Castola V. and Casanova J. (2006). Composition of a Pyrolytic oil from *Cupressus funebris* Endl. of Vietnamese origin. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 3, 453-457.
19. Duquesnoy E., Castola V. and Casanova J. (2007). Composition and chemical variability of the twig oil of *Abies alba* Miller from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(4), 293-299.
20. Duquesnoy E., Marongiu B., Castola V., Piras A., Porcedda S. and Casanova J. (2010). Combined analysis by GC(RI), GC-MS and ¹³C-NMR of the supercritical fluid extract of *Abies alba* twigs. *Natural Product Communications*, 5(12), 1995-1998.
21. Fernandez X., Michel H. and Paris J-P. (2012). Analyses physico-chimiques des huiles essentielles, 126-144. In Chemat F., & Fernandez, X. (2012). *La Chimie des Huiles Essentielles: Tradition et Innovation*. Vuibert: Paris, France. 274 p.
22. Garcia G., Garcia A., Gibernau M., Bighelli A. and Tomi F. (2017). Chemical compositions of essential oils of five introduced conifers in Corsica. *Natural Product Research*, 31(14), 1697-1703.

23. Gerling N.V., Punegov V.V., Gruzdev I.V. and Tarasov S.I. (2018). Component composition of *Abies sibirica* (Pinaceae) needle essential oil from the Komi Republic. *Rastitel'nye Resursy*, 54(1), 119-129, 2018.
24. Gonny M., Cavaleiro C., Salgueiro L. and Casanova J. (2006). Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³C- NMR. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(1), 99-106.
25. Idžojić M. & Pfeifhofer H.W. (2001). Composition of volatiles from needles of *Pinus nigra* Arnold, *P. sylvestris* L. and their hybrids. *Sauteria*, 11:367–382
26. Ioannou E., Koutsaviti A., Tzakou O. and Roussis V. (2014). The genus *Pinus*: A comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species. *Phytochemistry Reviews*, 13, 741-768.
27. Kaboré K., Konaté K., Sama H., Dakuyo R., Sanou A., Bazié D., Diao M., and Dicko M. H. (2022). Evaluation of the physicochemical parameters of edible oils sold in the three cities of Burkina Faso. *Food Science & Nutrition*, 10 (6), 2029-2035.
28. Kaloustian J. & Hadji-Minaglou F. (2012). La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. *Springer*, 206 p.
29. Kanko C., Sawaliho B.E.H., Kone S., Koukoua G. and N'Guessan Y.T. (2004). Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus chimie*, 7(10-11), 1039-1042.
30. Karousou, R., Koureas, D. N. and Kokkini, S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66(22), 2668-2673.
31. Khedhri S., Khammassi M., Amri I., Mabrouk Y., Fergeni Dh., Gargouri S., Hanana M., Jamoussi B. and Hamrouni L. (2022). Phytochemical studies on essential oil of *Pinus pinaster* Aiton and evaluation of their biological activities. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 8(2), 75-98.
32. Khouja M., Elaissi A., Ghazghazi H., Boussaid M., Khouja M.L., Khaldi A. and Messaoud C. (2020). Variation of essential oil composition, antioxidant and anticholinesterase activities between *Pinus halepensis* Mill. plant organs. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(6), 1450-1462.

33. Koedam A., Scheffer J.J. and A. Baerheim Svendsen (1980). Monoterpenes in the Volatile Leaf Oil of *Abies x arnoldiana* Nitz. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(4), 862-866.
34. Kouamé F.P.B.K. (2012). Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. *Thèse de doctorat*, chimie organique, Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. 180 p.
35. Koukos P., Papadopoulou K., Papagiannopoulos A. and Patiaka D.T. (2001). Essential oils of the twigs of some conifers grown in Greece. *Holz als Roh- und Werkstoff*. 58(6):437–438.
36. Kozan E., İlhan M., Tumen I., Akkol E.K. (2019). The scolicidal activity of the essential oil obtained from the needles of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe on hydatid cyst. *Journal of Ethnopharmacology*. 235, 243–247.
37. Kubeczka K. & Schultze W. (1987). Biology and chemistry of conifer oils. *Flavour and fragrance journal*, 2 (4):137–148.
38. Kurose K., Okamura D. and Yatagai M. (2007). Composition of the essential oils from the leaves of nine *Pinus* species and the cones of three of *Pinus* species. *Flavour and fragrance journal*, 22 (1), 10-20.
39. Laakso Y.H.I. & Hiltunen R. (1994). The enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons as a chemotaxonomic marker in *Abies sachalinensis* (Fr. Schm.) Mast. and *A. mayriana* Miy. et Kudo needle essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 9 (5), 223-227, 1994.
40. Lee J.H., Yang H.Y., Lee H.S. and Hong S.K. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from cones of *Pinus koraiensis*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(3), 497-502.
41. Li R. Jiang Z.T. & Yu J.C. (2005). Essential oil composition of the needles of *Abies nephrolepis* Maxim from China. *Flavour and fragrance journal*, 20(5), 534-536.
42. Lis A., Lukas M. and Mellor K. (2019). Comparison of chemical composition of the essential oils from different botanical organs of *Pinus mugo* growing in Poland. *Chemistry & Biodiversity*, 16 (10), e1900397.
43. Loizzo M.R., Saab A.M., Tundis R., Menichini F., Bonesi M., Statti G.A. and Menichini F. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Pinus brutia* (Calabrian pine) growing in Lebanon. *Chemistry of natural compounds*, 44, 784-786.
44. Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Perrucci S., Franceschi A., Macchioni G. and Ceccarini L. (2002). Acaricidal activity of pine essential oils and their main components

against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(16), 4586–4588.

45. Macchioni F., Cioni PL., Flamini G., Morelli I., Maccioni S. and Ansaldi M. (2003). Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and fragrance journal*, 18(2):139–143.

46. Mitic ZS., Jovanovic B., Jovanovic SC., Mihajilov-Krstev T., Stojanovic-Radic ZZ., Cvetkovic VJ., Mitrovic TL., Marin PD., Zlatkovic BK. and Stojanovic GS. (2018). Comparative study of the essential oils of four *Pinus* species: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 111, 55–62.

47. Morin P., Gunther C., Peyron L. and Richard H. (1985). Study of the physical and chemical phenomena involved in steam distillation. *Bulletin de la Société Chimique de France*, (5), 921–930.

48. Nam A.M., Casanova J., Tomi F. and Bighelli A. (2014). Composition and chemical variability of Corsican *Pinus halepensis* cone oil. *Natural product communications*, 9(9), 1934578X1400900935.

49. Nam A.M., Bighelli A., Ghanmi M., Satrani B., Casanova J. and Tomi F. (2015). Deodarone isomers in *Cedrus atlantica* essential oils and tar oils. *Natural Product Communications*. 10 (11), 1905–1906.

50. Neubeller J. (1990). Waxes and essential oils in needles of *Abies* species. *Gartenbauwissenschaft*, 55(2), 55–59.

51. Oh H.J., Ahn H.M., So K.H., Kim S.S., Yun P.Y., Jeon G.L. and Riu K.Z. (2007). Chemical and antimicrobial properties of essential oils from three coniferous trees *Abies koreana*, *Cryptomeria japonica*, and *Torreya nucifera*. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 50(3), 164–169.

52. Politeo O., Botica I., Bilusic T., Jukic M., Carev I., Burcul F. and Milos M. (2011^b). Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (30):6590–6596.

53. Politeo O., Skocibusic M., Maravic A., Ruscic M. and Milos M. (2011^a). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic Dalmatian black pine (*Pinus nigra* ssp. *dalmatica*). *Chemistry & Biodiversity*, 8(3):540–547.

54. Ramdani M., Lograda T., Chalard P. and Figueredo G. (2014). Chemical and antimicrobial properties of essential oil of *Abies numidica*, endemic species of Algeria. *International Journal of Phytopharmacology*, 5, 432-440.
55. Rezzi S., Bighelli A., Mouillot D. and Casanova J. (2001). Composition and chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(5):379–383.
56. Roussis V., Petrakis P.V., Ortiz A. and Mazomenos B.E. (1995). Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*, 39(2):357–361.
57. Sánchez-Robles J.M., Balao F., Terrab A., García-Castaño J.L., Ortiz M.A., Vela E. and Talavera S. (2014). Phylogeography of SW Mediterranean firs: different European origins for the North African *Abies* species. *Molecular phylogenetics and evolution*, 79, 42-53.
58. Sarac Z., Matejic J.S., Stojanovic-Radic Z.Z., Veselinovic J.B., Dzamic A.M., Bojovic S. and Marin P.D. (2014). Biological activity of *Pinus nigra* terpenes – evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in biology and medicine*, 54, 72-78.
59. Satou T., Matsuura M., Takahashi M., Murakami S., Hayashi S., Sadamoto K. and Koike K. (2011). Components of essential oils extracted from leaves and shoots of *Abies* species in Japan. *Chemistry & Biodiversity*, 8(6), 1132-1138.
60. Satyal P., Paudel P., Raut J., Deo A., Dosoky N.S. and Setzer W.N. (2013). Volatile constituents of *Pinus roxburghii* from Nepal. *Pharmacognosy Research*, 5(1), 43.
61. Schicchi R., Geraci A., Rosselli S., Maggio A. and Bruno M. (2017). Chemodiversity of the essential oil from leaves of *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei. *Chemistry & Biodiversity*, 14 (2), e1600254.
62. Singh H.P., Kaur S., Negi K., Kumari S., Saini V., Batish D.R. and Kohli R.K. (2012). Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT-Food Science and Technology*, 48: 237-241.
63. Thai T.H., Hien N.T., Diep L.N., Paoli M., Casanova J. and Tomi F. (2019). Chemical composition of needle, cone, and branch oils from Vietnamese *Pinus cernua*. *Natural Product Communications*, 14 (5), 1934578X19850992.
64. Tlili-Ait Kaki Y., Bennadja S. and Chefrour A. (2013). Revalorisation d'une essence endémique: Le sapin de Numidie (*Abies numidica*). *Flora Mediterranea*, 23, 123–129.

65. Tumen I., Hafizoglu H., Kilic A., Donmez IE., Sivrikaya H. and Gulsoy S.K. (2009). Essential oil yields of cones from Pinaceae family grown natively in Turkey. *Forest, Wildlife and Wood Sciences for Society Development*, 543-548.
66. Tumen I., Hafizoglu H., Kilic A., Donmez IE., Sivrikaya H. and Reunanen M. (2010). Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. natively grown in Turkey. *Molecules*. 15(8):5797–5806.
67. Ucar G. & Balaban M. (2004). Volatile needle extractives of Anatolian black pine varieties: *P. nigra* subsp. *Pallasiana* var. *pallasiana* and var. *pyramidata*. *Biochemical systematics and Ecology*, 32(11), 983-992.
68. Vekiari SA, Protopapadakis EE, Papadopoulou P, Papanicolaou D, Panou C. and Vamvakias M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(1): 147-153.
69. Vidrich V., Fusi P., Michelozzi M. and Franci M. (1996). Analysis of essential oils from leaves and branches of different Italian provenances of *Pinus nigra*. *Ann. Journal of Essential Oil Research*, 8(4):377–381.
70. Yang S.A., Jeon S.K., Lee E.J., Im N.K., Jhee K.H., Lee S.P. and Lee I.S. (2009). Radical scavenging activity of the essential oil of silver fir (*Abies alba*). *Journal Clinical Biochemistry Nutrition*, 44(3), 253-259.
71. Yang X., Zhang H., Zhang Y., Zhao H., Dong A., Xu D., Yang L., Ma Y. and Wang J. (2010). Analysis of the essential oils of pine cones of *Pinus koraiensis* Steb. Et Zucc. and *P. sylvestris* L. from China. *Journal of Essential Oil Research*, 22(5), 446-448.
72. Yang X., Zhao H.T., Wang J., Meng Q., Zhang H., Yao L., Zhang Y. C., Dong A. J., Ma Y., Wang Z. Y., Xu D.C. and Ding Y. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil of pine cones of *Pinus armandii* from the Southwest region of China, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (16), 1668-1672.

II. Activités biologiques des huiles essentielles

*Activité antioxydantes
& antiacétylcholinestéras
es*

II. Les activités biologiques

II.1. Activités antioxydantes

L'évaluation de l'activité antioxydante ou antiradicalaire repose sur la détermination de la concentration à laquelle un extrait spécifique devient efficace. Le mécanisme de l'activité antioxydante est diversifié et peut se manifester à travers différents processus. En raison de sa complexité, sa mise en œuvre nécessite la réalisation de multiples tests (Mata et al., 2007). De plus, étant donné la variété de ces derniers, les résultats d'un unique test ne peuvent fournir qu'une indication préliminaire de la propriété antioxydante des extraits testés. Il est impératif de conduire plusieurs tests afin d'obtenir une comparaison plus précise des résultats, couvrant ainsi un large éventail d'applications potentielles (Alam et al., 2013). Cette démarche permet de confirmer de manière indiscutable la propriété antioxydante de l'extrait sous-évaluation (Kanatt et al., 2007). Ainsi, l'effet protecteur antioxydant des huiles essentielles (HEs) issues de différentes parties d'*A. numidica* et de *P. nigra* sp. *mauretanica* a été évalué in vitro en utilisant diverses méthodes. Ces méthodes ont été employées pour évaluer la capacité des HEs à capturer les radicaux libres, à réduire les composés oxydés et à inhiber la peroxydation des lipides. L'activité antioxydante des HEs a été déterminée en mesurant leur aptitude à fournir des électrons ou des atomes (Bibi Sadeer et al., 2020; Ivanova et al., 2020; Platzer et al., 2021; Munteanu & Apetre, 2021), contribuant ainsi à stabiliser les radicaux libres et à prévenir les dommages oxydatifs.

La capacité antioxydante a été mesurée par cinq méthodes complémentaires : le pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium, l'activité antiradicalaire au DPPH, l'activité scavenger à l'égard de l'ABTS, le test au phosphomolybdate et le test de blanchiment du β -carotène/acide linoléique.

II.1.1. Activité scavenger du radical DPPH[•]

L'activité antiradicalaire mesure la neutralisation du radical DPPH[•] par les constituants des HEs; exprimée en IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 % de radicaux). Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite, plus l'HE en question est antioxydante. Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH[•] par les HEs des deux espèces sélectionnées à partir des différents organes sont présentés dans le **Tableau 11** et comparés à l' α -tocophérol (antioxydant de référence) et à certaines molécules pures des HEs (caryophyllène oxyde, b-caryophyllène et carvacrol).

Tableau11 :Activitéinhibitrice du DPPH• des HEs de *P.nigra* et d' *A.numidica*.

Organe végétal	CI ₅₀ (mg/ml)
<i>Pinus nigra</i>	
Aiguilles	260.93 ± 37.35 ^A
Branches	93.72 ± 6.85 ^B
Cônes	94,53 ± 3. 86 ^B
<i>Abies numidica</i>	
Aiguilles	44.86 ± 0.14 ^D
Branches	72.12 ± 1..32 ^C
Cônes	5.39± 0.7 ^E
Molécules et standard	
β-pinene	7.52 ± 0.21 ^E
β-caryophyllene	3.43 ± 0.12 ^E
Thymol	0.02 ± 0.00 ^F
Carvacrol	39.28 ± 1.24 ^D
Carvone	6.73 ± 0.18 ^E
Caryophyllene oxyde	6.51 ± 0.47 ^E
α-tocopherol	0.142 ± 0.003 ^F

Les moyennes ne partagent aucune lettre sont significativement différentes (ddl=12; F = 141.74 ; P = 0.000).

Les HEs des deux plantes présentent un faible pouvoir antioxydant. En effet, à la concentration de 100 mg/ml, les HEs des branches et des cônes de *P.nigra* testées réduisent plus de 50% le radical DPPH, les HEs des feuilles ont inhibé que 31.08 ± 0.11 % du radical DPPH. Tandis que pour les huiles essentielles d' *A.numidica*, nous n'avons trouvé qu'une faible inhibition à la concentration de 100 mg/mL (pour les branches). Pour les cônes, nous avons enregistré une activité comparable ou similaire à celle du témoin positif, le α-tocopherol et autres molécules des HEs.

Les HEs obtenues de différentes parties de *P.nigra* présentent des valeurs de CI₅₀ allant de 93.72 mg/mL à 260.93 mg/L, alors qu'à partir des organes aériens d' *A.numidica*, les CI₅₀

sont de 44.86 mg/L pour les aiguilles, de 72.12 mg/L pour les branches et de 5.39 mg/mL pour les cônes.

Au vu des résultats obtenus, les conclusions suivantes ont été déduites :

- Les huiles essentielles (HEs) des deux espèces ont la capacité de neutraliser le radical DPPH[•], et cette propriété présente des variations notables ($P < 0,05$) en fonction de l'organe et de l'espèce considérés. À l'exception des huiles extraites des cônes d'*A. numidica*, les autres HEs examinées ont révélé une capacité limitée à piéger le radical DPPH[•],

- Le composé de référence (α -tocophérol) et les molécules (pures) des huiles essentielles utilisées comme témoins positifs ont démontré une activité antioxydante exceptionnellement forte, à l'exception du carvacrol pour lequel la valeur de l'CI₅₀ observée est supérieure à celles des huiles essentielles extraites des aiguilles et des cônes d'*A. numidica*.

- *A. numidica* présentent les HEs ayant la meilleure activité scavenger du radical DPPH[•], comparativement à celles de *P. nigra*, pour l'ensemble des organes végétales,

- L'activité scavenger des huiles essentielles et des standards suit l'ordre suivant :

Thymol > α -tocophérol > β -caryophyllène > HEs-cônes (*A. numidica*) > caryophyllène oxyde > carvone > β -pinène > HEs-feuilles (*A. numidica*) > HEs-branches (*A. numidica*) > HEs-branches (*P. nigra*) > HEs-cônes (*P. nigra*) > HEs-feuilles (*P. nigra*).

Peu d'investigations sur la variation de l'activité antioxydante des HEs des Pinaceae en fonction de l'organe végétal de l'espèce valorisée ont été décrites dans la littérature. Cela a rendu nos comparaisons difficile et à limiter nos justifications pour les variations observées.

Selon [Yener et al. \(2014\)](#) et [Politeo et al. \(2011b\)](#), les HEs des feuilles de *P. nigra* et de *P. nigra* ssp. *dalmatica* de Turquie et de Croatie ont montré une très faible activité de DPPH à des concentrations < 1 mg/mL. Ces résultats rejoignent ceux trouvés dans la présente étude. Il est vraisemblable qu'un certain nombre de limitations aient pu influencer les résultats, qu'elles soient liées à des conditions expérimentales particulières dans les tests DPPH ([Apetrei et al., 2013](#)) ou à d'autres paramètres exogènes. A titre d'exemple, [Anderson et al. \(1992\)](#), ont souligné la variation saisonnière/composition chimique de l'activité antioxydante des HEs de *P. strobes*. Ils ont noté une diminution significative de deux à quatre fois entre l'hiver et l'été. Ces résultats corroborent avec notre étude, où des activités significatives ont été obtenues avec des concentrations > 1 mg/mL.

Par ailleurs, les activités obtenues avec les huiles essentielles d'*A. numidica* restent très faibles par rapport à la molécules de référence. L'huile essentielle extraite à partir des cônes présente une activité remarquable avec une CI_{50} 8,32 fois moins que les feuilles et 13,37 fois moins que les branches. Cette activité pourrait être expliquée par des variations qualitatives et quantitatives du profil chimique des organes étudiés. Il ressort que l'organe végétal le plus antioxydant est le cône qui contient plus de terpènes oxygénés que les autres organes examinés suivi par les HEs des feuilles (CI_{50} = 44.86 mg/mL) et de celles de branches (CI_{50} = 72, 12 mg/mL).

Le potentiel antioxydant des HEs dépend principalement de leur contenu chimique (Bhavaniramy et al., 2019) et est directement lié aux terpènes oxygénés (Ferreira et al., 2017), en particulier les terpénoïdes avec des groupes phénoliques tels que le méthylchavicol, le thymol et l'eugénol (Politeo et al., 2011; Nehme et al., 2021) et pourraient être responsables d'une forte activité antioxydante (Miladi et al., 2013). Il a également été rapporté que les hydrocarbures monoterpéniques peuvent être considérés comme des antioxydants actifs, mais avec une activité moindre que les monoterpènes oxygénés. En revanche, les hydrocarbures sesquiterpéniques et leurs dérivés oxygénés présentent une très faible activité antioxydante (Zengin et Baysal, 2014). Par ailleurs, d'autres composants tels que certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes jouent également un rôle clé dans les capacités antioxydantes des huiles essentielles (Bhavaniramy et al., 2019). De plus, selon les conditions expérimentales et la composition de l'HE, un effet antagoniste ou synergique peut se produire entre les composés (Amorati et al., 2013). D'autres facteurs (solubilité des composés ou stéréosélectivité des radicaux) dans différents protocoles antioxydants peuvent modifier la capacité de l'huile à réduire de nombreux radicaux (Grassmann, 2005; Postu et al., 2019).

II.1.2. Activité antiradicalaire de l'ABTS^{•+}

Dans ce modèle, on a également mis en évidence le potentiel antioxydant aussi bien des HEs extraites, que des molécules de référence, dans lequel on a observé, d'une part un effet dose-dépendant et, d'autre part une variabilité intraspécifique de l'effet antioxydant. A l'issue de cette expérimentation, il apparaît là aussi de la même manière que pour l'activité antiradicalaire du radical DPPH, l'effet scavenger à l'égard de l'ABTS est observé à des concentrations plus élevées. La meilleure activité est enregistrée avec les huiles d'*A. numidica* (les cônes; CI_{50} 2.15 ± 0.27 mg/mL; les feuilles avec CI_{50} = 33.56 ± 0.46 mg/mL). Ces valeurs restent toujours inférieures à celles obtenues pour l' α -tocophérol et à certaines autres molécules de référence, utilisées comme un témoin positif (Tableau 12).

Tableau12 :Activitéinhibitricedel'ABTS^{•+} desHESde*P.nigra*etd'*A.numidica*.

Organevégétal	CI ₅₀ (mg/ml)
<i>Pinusnigra</i>	
Aiguilles	91.12 ± 5.56 ^A
Branches	40.43 ± 3.53 ^D
Cônes	56.89 ± 2.28 ^B
<i>Abiesnumidica</i>	
Aiguilles	33.56 ± 0.52 ^E
Branches	50.12 ± 0.12 ^C
Cônes	2.15 ± 0.33 ^{GH}
Moléculesetstandard	
β-pinene	25,51 ± 0,19 ^F
β-caryophyllene	4,24 ± 0,09 ^G
Thymol	0,01 ± 0,00 ^H
Carvacrol	0.02 ± 0.00 ^H
Carvone	4,77 ± 0,23 ^G
Caryophyllene oxyde	58,24 ± 0,80 ^B
α-tocopherol	0,04 ± 0,00 ^H

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes (ddl = 12 ; F = 688.16 ; P = 0.000).

Contrairement au DPPH, une diminution dans les valeurs des CI₅₀ est remarquée pour chaque organe testé, mais l'activité antioxydante reste toujours faible. Néanmoins, ce test a montré que l'huile des feuilles possède l'activité la plus faible (CI₅₀ = 91.12 ± 5,56 mg/mL).

Comme mentionné précédemment, en raison du manque d'études sur la variation de l'activité antioxydante des huiles essentielles (HES) des Pinaceae en fonction de l'organe et de l'espèce végétale, l'importance de la recherche scientifique sur l'activité antioxydante dans les études sur la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques en lien avec l'évaluation de leurs activités biologiques est abondante. De nombreux travaux ont démontré que l'activité d'une huile essentielle est liée aux composés majoritaires et aux éventuels effets synergiques entre les constituants (Oussou et al., 2009; Oussou et al., 2010; Saint et al., 2003;

(Kalemba & Kunicka, 2003). En général, les huiles essentielles riches en composés oxygénés ont une activité anti-radicalaire plus prononcée que celles à terpènes hydrocarbonés (Benov & Georgeiv, 1994). En effet, l'huile essentielle des cônes d'*A. numidica* qui a présenté une plus grande activité antioxydante est riche en monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés (15.7 %). La manifestation de ces activités est bien cohérente et en accord avec l'hypothèse précédemment énoncée. De plus, des composés tels que le thymol, le carvacrol, l'eugénol sont reconnus pour leurs puissantes propriétés antioxydantes. Ces composés, grâce à leurs propriétés redox, agissent comme des agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulet (Rice-Evans et al., 1995; Tepe et al., 2005; Tepe et al., 2007).

II.1.3. Test au phosphomolybdate

La quantification spectrophotométrique de la capacité antioxydante par la méthode du phosphomolybdène a été considérée comme une bonne alternative pour la détermination de la vitamine E dans une variété d'échantillons lipophiles (Prieto et al., 1999). En présence d'antioxydants, le molybdène (VI) est réduit en molybdène (V) par transfert d'électron ou d'atome d'hydrogène (Bibi Sadeer et al., 2020). C'est un test quantitatif parce que les résultats sont exprimés en équivalent d'acide ascorbique. Dans cette méthode particulière, les Figures 39 et 40 illustrent une régression linéaire positive pour toutes les HEs testées. Les résultats montrent une meilleure activité antioxydante que les tests précédents.

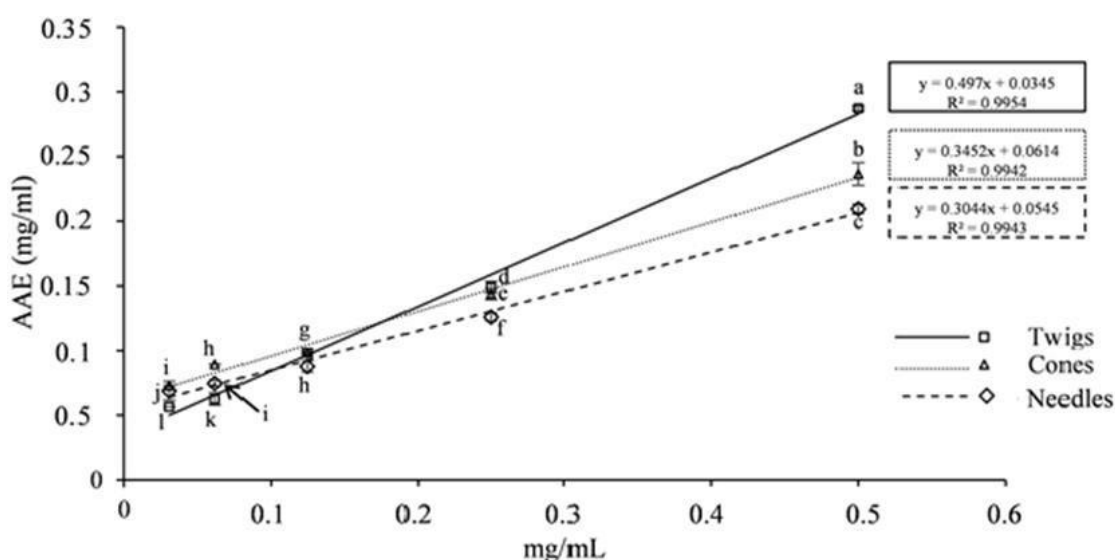


Figure 39: Activité antioxydante totale des HEs de *A. numidica*.
Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ($P < 0.05$).

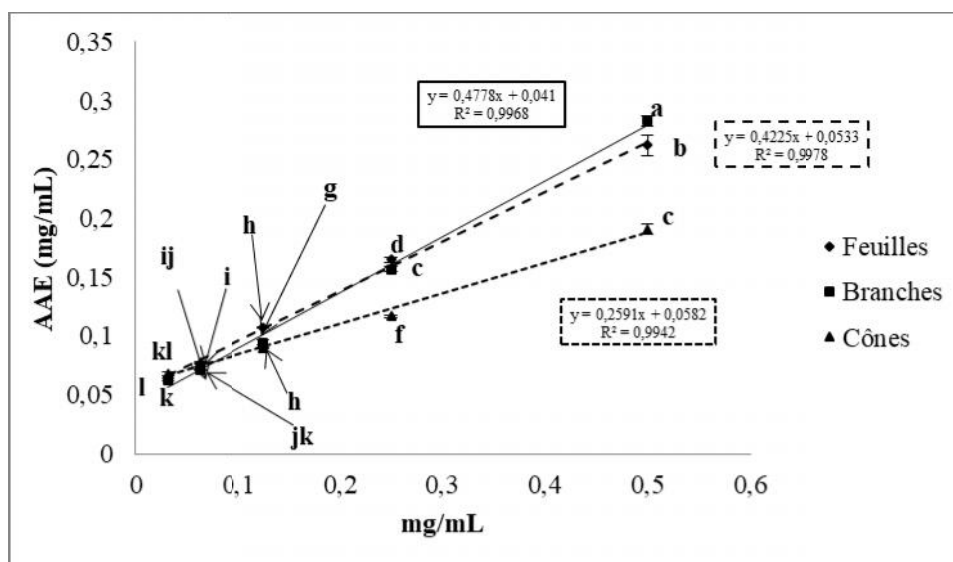


Figure40:ActivitéantioxydantetotaledesHesde*P. nigra*.

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ($P < 0.05$).

Pour l'espèce *A. numidica*, les HEs des cônes ont présenté une activité supérieure à celle desfeuillesetdesbranchesdanslagammedeconcentrationsde0,03125à0,125mg/mL,avec unedifférencestatistiquementsignificative($P < 0,05$).À0.125mg/mL,lesHEsdesfeuilleset des branches ont légèrement présenté une forte activité comparativement aux cônes. À des concentrationsallantde0,125à0,50mg/mL,lesbranchesontprésentél'activitélaplusélevée, suivis par les cônes et les feuilles, dans cet ordre, avec une différence statistiquement significative($P < 0,05$).En outre,à0,5mg/mL,lesbranchesontprésentéuneactivitésupérieure àcelledel'acideascorbiqueà0,25mg/mL,tandisquelescônesetlesfeuillesà0,5mg/mLont montré une activité supérieure à celle de l'acide ascorbique à 0,2 mg/mL.

LesHEsdesdifférentespartiesde*P. nigra*ontexhibéuneactivitéréductricedesions Mo^{+6} proportionnelle à la concentration utilisée. L'HE des cônes a révélé une activité légèrement supérieureàcelledesfeuillesetdesbranchesauxconcentrationsde0,03125et0,0625mg/mL, avec une différence statistiquement non significative ($P < 0,05$) et, une activité faible aux concentrationsallantde0.125à0.25mg/mL(avecunedifférencestatistiquementsignificative ($P < 0,05$)). En outre, les HEs des feuilles et des branches ont montré une forte capacité antioxydante proportionnelleàlaconcentrationutilisée,surtoutdansl'intervallede0.125à0.25 mg/mL. À 0.5 mg/mL, les HEs des branches se singularisent avec une très forte activité antioxydante,avecunedifférencestatistiquementsignificative($P < 0,05$).Par rapportàl'acide ascorbique, les deux HE ont présenté une activité élevée aux concentrations de 0,03125 et 0,0625 mg/mL, tandis que de faibles activités ont été enregistrées à 0,125,0,25 et 0,5 mg/mL.

En conclusion, le test du phosphomolybdène a montré le meilleur pouvoir antioxydant parmi tous les échantillons testés, comparé aux systèmes DPPH, ABTS, β -carotèneet pouvoir réducteur. Malheureusement, il n'existe pas d'études récentes sur le potentiel antioxydant de *P. nigra* ssp. *mauretanica* et d'*A. numidica* ciblant à la fois les feuilles, les branches et les cônes, qui pourraient être comparées à nos résultats. Ainsi, le mécanisme d'action antioxydant ne peut être compris sans avoir recours à diverses hypothèses existantes comme, par exemple, l'influence d'une variété de produits phytochimiques actifs, y compris : vitamines, caroténoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes, flavonoïdes, lignanes, phénols simples, acides phénoliques (Gupta & Rajpurohit, 2011), la présence ou l'absence de composants hydrocarbonés (Villano et al., 2007), les méthodes d'extraction/détection (Apetrei et al., 2013).

II.1.4. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

Cet essai permet de mesurer la capacité des HES à réduire les ions métalliques fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) en présence d'antioxydants (Goze et al. 2009; Munteanu & Apetrei, 2021). La capacité de réduction est un marqueur important du potentiel antioxydant d'un composé. Elle affiche un profil similaire à celui des concentrations de substances antioxydantes, dont l'intensité est régulée par leur nature et leur concentration. Une capacité de réduction élevée indique une activité antioxydante efficace, qui peut être liée à la présence d'antioxydants dans la composition (tels que les phénols ou les dérivés oxygénés) (Priore et al. 2005).

Les figures 41 et 42 montrent que le pouvoir réducteur des HES et de l' α -tocophérol augmente progressivement avec la concentration.

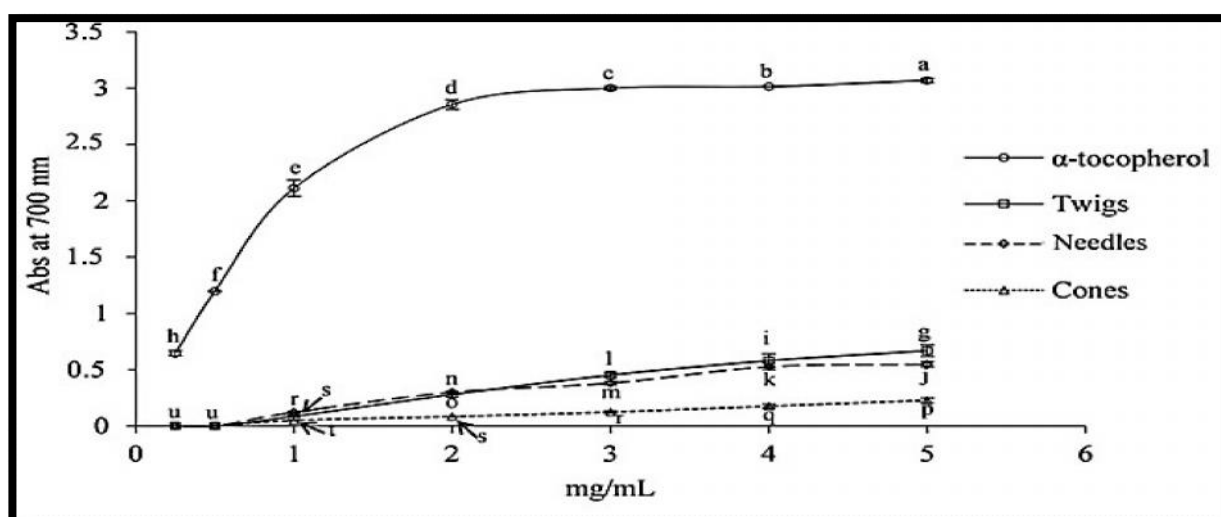


Figure 41: Activité antioxydante totale des HES d'*A. numidica*
Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ($P < 0.05$).

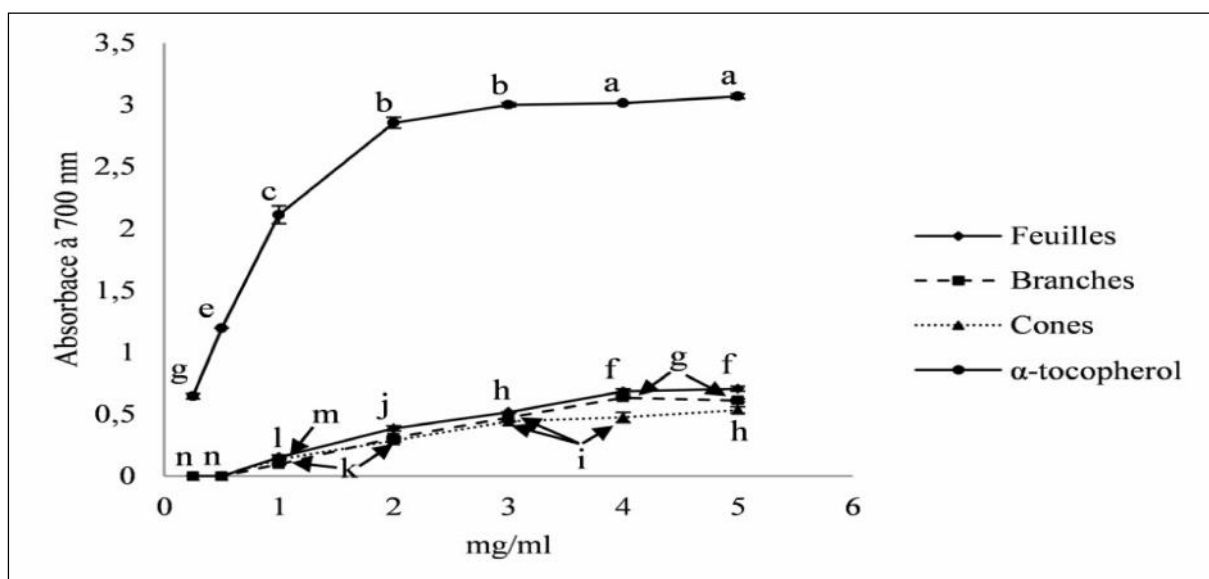


Figure 42: Activité antioxydante totale des HEs de *P. nigra*

Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes ($P < 0.05$).

En ce qui concerne les HEs de *P. nigra*, à toutes les concentrations testées les feuilles démontrent une activité supérieure à celle des deux autres organes, avec des différences statistiquement significatives ($P < 0,05$). Comparativement à l'α-tocophérol et à 0,25 mg/mL, les HEs des branches (à 4 et 5 mg/mL) et des feuilles (à 4 mg/mL) ne montrent pas de variations significatives ($P < 0,05$). Une activité élevée a été notée à 5 mg/mL avec des différences significatives ($P < 0,05$) pour les feuilles. Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par [Ulukanli et al. \(2014\)](#), concernant le pouvoir réducteur des HEs de *P. pinea* et *P. brutia* à 20 mg, qui s'est avéré supérieur à celui de l'α-tocophérol (10 mg). Pour les HEs des cônes (à 1 et 2 mg/mL), l'analyse de variance à deux facteurs n'a pas révélé de différences significatives ($P < 0,05$) par rapport à la capacité réductrice observée dans les deux autres organes aux mêmes concentrations. Toutefois, une capacité réductrice modérée a été mise en évidence avec des concentrations de 3 à 5 mg/mL.

Par ailleurs, toutes les HEs d'*A. numidica* ont montré une capacité réductrice, des ions Mo^{6+} , à des concentrations supérieures à 1 mg/mL, ce qui était nettement inférieur à la concentration d'α-tocophérol de 0,25 mg/mL, à l'exception des branches à 5 mg/mL (voir **Figure 41**). Cette différence était statistiquement significative ($P < 0,05$), sauf pour les concentrations de 0,25 et 0,5 mg/mL, où aucune des HE ne présentait d'activité antioxydante. Les feuilles ont montré une activité plus élevée que les branches et les cônes à 1 et 2 mg/mL. À 3 et à 5 mg/mL, les branches présentent l'activité la plus élevée, suivie de feuilles et cônes, respectivement.

Au terme de cette activité, les résultats du pouvoir réducteur enregistrés, pour toutes les HES testées, semblent être meilleurs que ceux de la décoloration des cations radicaux dérivés de l'ABTS et de la décoloration des radicaux DPPH.

II.1.5. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode β -carotène/acide linoléique

C'est l'une des méthodes complémentaires utilisées pour le criblage de substances antioxydantes. Elle est basée sur le principe que l'acide gras insaturé, l'acide linoléique, s'oxyde spontanément avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) présentes dans l'eau riche en oxygène. Cela est attribué à l'acide linoléique qui génère des hydro-péroxydes lors de son incubation à 50°C (Kubola & Siviamornpun, 2008). Ces hydro-péroxydes attaquent les insaturations du β -carotène, ce qui entraîne la disparition de sa couleur distinctive. Le degré de décoloration est mesuré par spectrophotométrie et utilisé comme une estimation de l'activité antioxydante (Khadri et al., 2008).

La méthode β -carotène/acide linoléique est pertinente pour l'étude des antioxydants lipophiles (Andrade et al. 2013). Néanmoins, cette méthode a fait l'objet de nombreuses critiques en raison de sa reproductibilité limitée et des problèmes de quantification (Prieto et al. 2012). Les résultats de l'activité antioxydante par la méthode du β -carotène/acide linoléique (Figure 43) montrent que toutes les HES ont été, néanmoins, des inhibiteurs moins puissants de l'oxydation du système β -carotène/acide linoléique que la molécule de référence, l' α -tocophérol qui présentait une CI_{50} de l'ordre $0,50 \pm 0,015$ mg/mL.

Les résultats obtenus avec les huiles essentielles de *P. nigra* indiquent une activité protectrice modérée envers le β -carotène. Les valeurs de CI_{50} calculées positionnent les feuilles en tête ($CI_{50} = 1,44 \pm 0,16$ μ g/mL), avec une efficacité notablement inférieure à celle de l' α -tocophérol, mais sensiblement supérieure à celle des aiguilles ($CI_{50} = 1,59 \pm 0,01$ μ g/mL) et des cônes ($CI_{50} = 2,64 \pm 0,17$ mg/mL).

En ce qui concerne les HES d'*A. numidica*, selon ce test, l'activité antioxydante la plus élevée a été de nouveau associée à l' α -tocophérol ($CI_{50} = 0,5 \pm 0,15$ mg/mL) suivie par l'HE des feuilles ($CI_{50} = 1,421 \pm 0,265$ mg/mL) et de l'HE des branches ($CI_{50} = 3,624 \pm 0,232$ mg/mL). Cependant, l'HE des cônes est apparue moins active ($CI_{50} = 9,328 \pm 0,333$ mg/mL). Comme illustré dans la Figure 43, ces données révèlent divers niveaux de protection contre l'oxydation du β -carotène, l' α -tocophérol se distinguant comme l'antioxydant le plus efficace. En comparaison, l'ABTS et le DPPH ont démontré une efficacité supérieure par rapport au test

du β -carotène,avec desactivitésplusélevéesobservéesàdesconcentrationsfaibles(1-5 mg/mL).

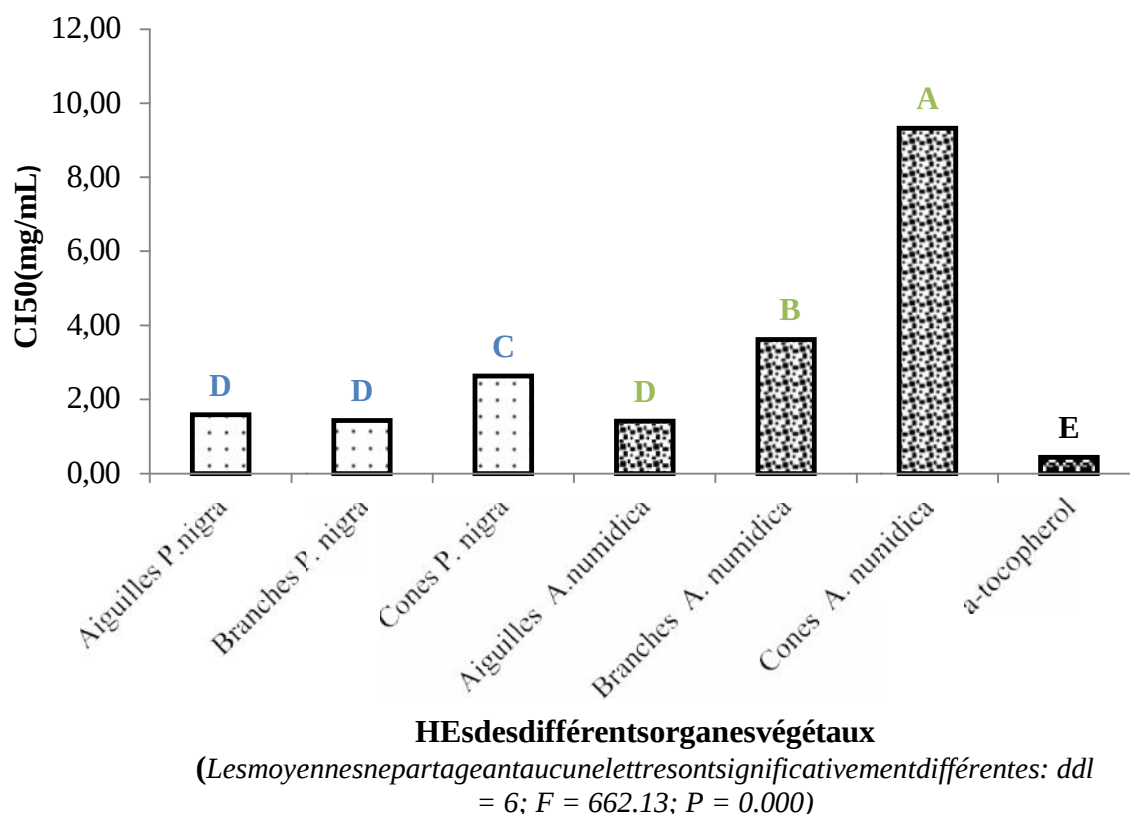


Figure43:Blanchissementdu β -carotènenparlesHESde*P.nigra*etd'*A.numidica*.

Au terme des tests de l'activité antioxydante des HES étudiées lors de ce travail, la variabilité, la variation, l'adéquation et l'efficacité de ces extractibles renforce le postulat de multiplicité des tests antioxydants pour en tirer une conclusion sur la nature et l'intensité de l'activité antioxydante révélée. [Lee & Shibamoto \(2002\)](#) ont souligné l'importance de mettre au point des tests fiables pour mesurer avec précision l'activité antioxydante des antioxydants naturels. Ils ont noté que le comportement antioxydant est souvent plus complexe dans les systèmes hydrophiles que dans les systèmes lipophiles. Par conséquent, les systèmes lipophiles peuvent fournir une évaluation plus précise de l'activité antioxydante des composés non polaires ou moins polaires. La justification de la recherche scientifique de l'activité antioxydante issue de ressources végétales, n'est plus à démontrer, en raison, d'une part, de l'apport positif de ces molécules naturelles sur la conservation des denrées alimentaires, et, d'autre part, de leurs rôles protecteurs vis-à-vis du stress oxydatif dû à l'excès de radicaux libres, et associé notamment à de nombreuses pathologies ([Rice-Evans et al., 1996](#); [Bravo, 1998](#)).

II.2. Évaluationdel'activitéanticholinestérase

Les HEs ont été évaluées, in vitro, pour leur capacité à inhiber les enzymes acétylcholinestérase(AChE)etbutyrylcholinestérase(BChE)enutilisantlaméthoded'Ellman (avec quelques modifications).

TouteslesHEsontinhibél'AChEdeplusde50%àlaconcentrationde45µg/mL(**Tableau 13**).

Tableau13 :Activitéinhibitrice(%)delacholinestérase(AChEetBChE)desHEsde *P. nigra* et d'*A. numidica*.

Echantillon	[AChECI ₅₀](µg/mL)	AChE ^a	BChE ^a
<i>P. nigra</i> (Aiguilles)	0.46	95.52	15.04
<i>P. nigra</i> (Branches)	29.55	92.28	20.60
<i>P. nigra</i> (Cônes)	26.36	82.88	33.43
<i>A.numidica</i> (Aiguilles)	4.09	77.88	26.47
<i>A.numidica</i> (Branches)	2.73	93.89	19.10
<i>A.numidica</i> (Cônes)	13.64	69.15	33.23

****IC₅₀-concentration(µg/mL)nécessairepouratteindre50%d'inhibitiondel'enzyme,**

****a-pourcentaged'inhibitionpourlaconcentrationmaximaletestée(45µg/mL).**

L'inhibitionétaitde95.52%pourlesaiguilles,92.28%pourlesbrancheset82.88%pour les cônes de *P. nigra*. Les concentrations d'HEs nécessaires pour réduire l'activité de l'AChE de50%(CI₅₀)étaientde0.46µg/mLpourlesaiguilles,29.55µg/mLpourlesbrancheset26.36 µg/mLpourlescônes.Lesaiguillesétaientcomparablesàlatacrine,unemoléculederéférence (CI₅₀= 1.21 µg/mL), en termes d'inhibition de l'AChE, tandis que les branches et les cônes avaient des IC₅₀supérieurs.

En ce qui concerne l'inhibition de la BChE, les HEs étaient moins efficaces que pour l'AChE et la tacrine, même à la concentration la plus élevée testée de 45 µg/mL. Les pourcentages d'inhibition de la BChE étaient de 33.43 % pour les cônes, 15.04 % pour les aiguilles et 20.60 % pour les branches.

Pour *A. numidica*, toutes les huiles essentielles testées ont fortement inhibé l'enzyme AChE, avec des taux d'inhibition supérieurs à 50 % à 45 µg/mL (concentration maximale utilisée):93,89%pourlesbranches,77,88%pourlesaiguilleset69,15%pourlescônes.Les concentrationsnécessaires pour inhiber l'AChEde50% (CI₅₀)étaient de 2,73µg/mLpour les

branches, 4,09 µg/mL pour les aiguilles et 13,64 µg/mL pour les cônes, avec les branches se rapprochant de l'efficacité de la tacrine (CI₅₀ = 1,21 µg/mL). En revanche, ces huiles étaient moins efficaces contre la BChE que contre l'AChE et la tacrine, avec des inhibitions de 33,23 % pour les cônes, 26,47 % pour les aiguilles et 19,10 % pour les branches à 45 µg/mL.

La forte activité anticholinestérase des HEs analysées peut être attribuée à leur profil chimique spécifique, et les variations de cette activité pourraient s'expliquer par les différences de concentration des composés actifs présents dans les huiles issues de diverses parties des plantes étudiées.

En effet, une étude sur les pins de Calabre (Italie) a révélé une inhibition notable de l'AChE et de la BChE par les HEs, surtout celles des aiguilles de *P. heldreichii* subsp. *leucodermis* (CI₅₀ de 51,1 µg/mL pour l'AChE et 80,6 µg/mL pour la BChE). Les HEs de *P. nigra* subsp. *nigra* ont aussi montré une forte inhibition de l'AChE (CI₅₀ de 94,4 µg/mL). Des composants (parmi ceux identifiés) tels que le terpinolène, le β-phellandrène, l'acétate de linalyle, le trans-caryophyllène et le terpinen-4-ol ont été évalués, avec le trans-caryophyllène et le terpinen-4-ol inhibant la BChE avec des IC₅₀ de 78,6 et 107,6 µg/mL, respectivement. Le β-phellandrène a démontré une sélectivité pour l'AChE avec un CI₅₀ de 120,2 µg/mL (Bonesi et al., 2010). Par ailleurs, l'α-pinène et le β-pinène, majoritaires dans les HEs de *P. nigra* subsp. *dalmatica*, ont été associés à une forte inhibition de l'AChE, ce qui pourrait justifier l'efficacité élevée des HEs de cette sous-espèce (Politeo et al., 2011). De même, Khouja et al. (2020) ont associé l'activité anticholinestérasique des huiles essentielles de pin d'Alep à la présence d'α-pinène, de β-pinène, de β-caryophyllène et d'oxyde de caryophyllène, connus pour inhiber les enzymes cholinestérasiques liées à la maladie d'Alzheimer et qui ont été largement signalés dans d'autres travaux sur l'activité anticholinestérase (Kivrak et al., 2009; Feitosa et al., 2017; Karakaya et al., 2019). Toutefois, l'étude n'a pas trouvé de corrélation directe entre la concentration de ces composés et l'inhibition des cholinestérasases, suggérant une synergie entre les terpènes dans les HEs de *P. halepensis* étudiées.

Le bon potentiel inhibiteur de l'AChE des HEs d'*A. numidica* résulter de la présence de l'α-pinène, de β-pinène et de limonène, reconnus pour leur effet inhibiteur sur cette enzyme (Perry, 2000; Burčul et al., 2020). Cependant, les HEs d'*A. numidica* de Djebel El-ouahch (Constantine) ont montré une faible inhibition de l'AChE (CI₅₀ = 153,92 ± 1,94 µg/mL) à 200 µg/mL (Benouchenne et al., 2022). Par ailleurs, Mokaddem-Daroui et al. (2021) ont trouvé

que l'extrait méthanolique des cônes d'*A. numidica* de la même région présente une inhibition modérée de la BChE et est inefficace contre l'AChE.

L'inhibition des cholinestérases par les HEs dépend des interactions complexes entre les différentes classes de composés terpéniques (Yener *et al.*, 2014; Benabdellah *et al.*, 2018). Il a également été signalé que certains composés isolés exercent des propriétés acétylcholinestérasiques et butyrylcholinestérasiques considérables lorsqu'ils sont testés individuellement (Bonesi *et al.*, 2010 ; Aaza *et al.*, 2011).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aazza S., Lyoussi B. and Miguel M. G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16(9), 7672-7690.
2. Alam MN., Bristi NJ. and Rafiquzzaman M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
3. Amorati R., Foti M. C. and Valgimigli L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10835-10847.
4. Anderson J. V., Chevone B. I., Hess J. L. (1992). Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles: evidence for thermal dependence. *Plant Physiology*, 98(2), 501-508.
5. Andrade M. A., das Gracas Cardoso M., de Andrade J., Silva L. F., Teixeira M. L., Valerio Resende J. M., da Silva Figueiredo A. C. and Barroso J. G. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis*. *Antioxidants* (Basel)). 2(4):384–397.
6. Apetrei L. C., Spac A., Brebu M., Tuchilus C. and Miron A. (2013). Composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of a full grown tree of *Pinus cembra* L. from the Calimani mountains (Romania). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78 (1):27–37
7. Benabdallah A., Boumendjel M., Aissi O., Rahmoune C., Boussaid M. and Messaoud C. (2018). Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. *South African Journal of Botany*, 116, 131-139.
8. Benouchenne D. J., Bellil I., Bensouici Ch., Yilmaz M. A., Akkal S., Kesinkaya H. B. and Khelifi D. (2022) GC-MS Chemical profile, antioxidant ability, antibacterial effect, α -glucosidase, α -amylase and acetylcholinesterase inhibitory activity of Algerian Fir essential oil. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15 (2): 303 – 310.
9. Benov L. & Georgiev N. (1994). The antioxidant activity of flavonoids isolated from *Corylus colurna*. *Phytotherapy Research*, 8(2), 92-94.
10. Bhavaniramy S., Vishnupriya S., Al-Aboody M. S., Vijayakumar R. and Baskaran D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49-55.

11. Bibi Sadeer N., Montesano D., Albrizio S., Zengin, G. and Mahomoodally M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety-Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
12. Bonesi M., Menichini F., Tundis R., Loizzo M.R., Conforti F., Passalacqua N.G., Statti G.A. and Menichini F. (2010). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(5), 622-628.
13. Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56 (11), 317-333.
14. Burčul F., Blažević I., Radan M. and Politeo O. (2020). Terpenes, Phenylpropanoids, Sulfur and Other Essential Oil Constituents as Inhibitors of Cholinesterases. *Current Medicinal Chemistry*, 27 (26), 4297-4343.
15. Feitosa C.M., dos Reis Barbosa A., Melo C.H.S., Freitas R.M., Fontes J.E.N., Costa E.V., Rashed K.N.Z. and Junior J.S.C. (2017). Antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Eugenia dysenterica* DC. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(19), 241-249.
16. Ferreira D.d.F., Nora F.M.D., Lucas B.N., Menezes C.R.d., Cichoski A.J., Giacomelli S.R., Wagner R. and Barin J.S. (2017). Oxygen introduction during extraction and the improvement of antioxidant activity of essential oils of basil, lemon and lemongrass. *Ciência Rural*, 47(8), 1- 6.
17. Goze I., Alim A., Tepe A.S., Sokmen M., Sevgi K. and Tepe B. (2009). Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3:246–254.
18. Grassmann J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins & Hormones*, 72:505-535.
19. Gupta A.D. & Rajpurohit D. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of nutmeg (*Myristica fragrans*). In: Preedy V.R., Watson R.R., Patel V.B., editors. *Nuts & seeds in health and disease prevention*. 1st ed. London, Burlington, San Diego: Elsevier; p. 831–839.
20. Ivanova A., Gerasimova E. and Gazizullina E. (2020). Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms. *Molecules*, 25 (18), 4251.
21. Kalemba D. & Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10:813-829.
22. Kanatt S.R., Chander R. and Sharma A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100: 451- 458.

23. Karakaya S., Yılmaz S.V., Koca M., Demirci B. and Sytar O. (2019). Screening of nonalkaloid acetylcholinesterase inhibitors from extracts and essential oils of *Anthriscus nemorosa* (M. Bieb.) Spreng. (Apiaceae). *South African Journal of Botany*, 125: 261-269.
24. Khadri A., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Neffati M., Smiti S. and Araújo M.E.M. (2008). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ¹³C NMR. *Food chemistry*, 109 (3), 630-637.
25. Khouja M., Elaissi A., Ghazghazi H., Boussaid M., Khouja M.L., Khaldi A. and Messaoud C. (2020). Variation of essential oil composition, antioxidant and anticholinesterase activities between *Pinus halepensis* Mill. plant organs. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(6), 1450-1462.
26. Kivrak Y., Duru M.E., Öztürk M., Mercan N., Harmandar M. and Topçu G. (2009). Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food chemistry*. 116: 470-479.
27. Kubola J. & Siriamornpun S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*. 110(4), 881-890.
28. Lee K.G. & Shibamoto T. (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (17), 4947-4952.
29. Mata A.T., Proença C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F. and Araújo M.E.M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103 (3): 778-786.
30. Miladi H., Slama R.B., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A. and Ammar E. (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5(6):729-739.
31. Mokaddem-Daroui H., Belhadj M., Aydogmus-Ozturk F., E. Erol, Ozturk M., Ertaş A., Emin Duru M., Kabouche A. and Kabouche Z. (2021). Antioxidant, anticholinesterase activities and polyphenolic constituents of cones of Algerian fir (*Abies numidica*) by LCESI-MS/MS with chemometric approach, *Journal of Research in Pharmacy*, 25 (3).
32. Munteanu I.G. & Apetrei C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (7), 3380.

33. Nehme R., Andrés S., Pereira R.B., Ben Jemaa M., Bouhallab S., Ceciliani F., López S., Rahali F.Z., Ksouri R., Pereira D.M. and Abdennebi-Najar L. (2021). Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants*, 10, 330.
34. Oussou K.R., (2009). Etude chimique et activité biologique des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan*, 241p.
35. Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Tue Bi B., Kanko C., Boti J.B., Ahibo C. and Casanova J. (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de l'huile Essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research*, 1:50-59.
36. Perry N.S., Houghton P.J., Theobald A., Jenner P. and Perry E.K. (2000). *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(7), 895-902.
37. Platzer M., Kiese S., Herfellner T., Schweiggert-Weisz U., Miesbauer O. and Eisner P. (2021). Common trends and differences in antioxidant activity analysis of phenolic substances using single electron transfer based assays. *Molecules*, 26(5), 1244.
38. Politeo O., Botica I., Bilusic T., Jukic M., Carev I., Burcul F., Milos M. (2011^b). Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (30):6590–6596.
39. Postu P.A., Sadiki F.Z., El Idrissi M., Cioanca O., Trifan A., Hancianu M. and Hritcu L. (2019). *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112:108673.
40. Prieto P., Pineda M. and Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269 (2):337–341.
41. Prieto M.A., Rodriguez-Amado I., Vazquez J.A. and Murado M.A. (2012). β -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36):8983-8993.
42. Prior R.L., Wu X. and Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

43. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M. and Pridham J.B. (1995). The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, (4):375-383.
44. Rice-Evans C.A., Miller N.J. and Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933- 956.
45. Saint Laumer D.J.Y., Frérot E. and Herrmann A. (2003). Controlled release of perfumery alcohols by neighboring-group participation. Comparison of the rate constants for the alkaline hydrolysis of 2-acyl-, 2-(hydroxymethyl)-, and 2-carbamoylbenzoates. *Helvetica Chimica Acta*, 86: 2871-2899.
46. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M. and Sokmen A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *roslans*. *Journal of Food Engineering*, 4: 447-454.
47. Tepe B., Sihoglu-Tepe A., Daferera D., Polissiou M. and Sokmen A. (2007). Chemical composition and activity of the essential oil *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry*, 3: 766-770.
48. Ulukanli Z., Karaborklu S., Bozok F., Burhan A., Erdogan S., Cenet M. and Karaaslan MG. (2014). Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(12):901–910.
49. Yener HO., Saygideger SD., Sarikurkcu C. and Yumrutas O. (2014). Evaluation of antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of *Pinus* Species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(2):295–302.
50. Zengin H. and Baysal A.H. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19(11), 17773-17798.

*Activités antibactériennes
&
antifongiques*

III. Activités antibactériennes des Huiles Essentielles de *P. nigra* et d'*A. numidica*

Des essais antibactériens ont été effectués en utilisant différentes dilutions des HES d'*A. numidica* et de *P. nigra* (1/2, 1/5, 1/10 V/V). L'ampicilline a servi d'antibiotique de référence.

Les résultats des essais antibactériens sont résumés dans le **Tableau 14** pour *P. nigra* et le **Tableau 15** pour *A. numidica*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont présentées dans les **Tableaux 16** et **17**

Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) en millimètres ont été mesurés pour évaluer l'efficacité des HES et de l'ampicilline contre trois souches bactériennes : *Dickeya dadantii*, *Dickeya solani* et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Une zone d'inhibition plus grande indique une activité antibactérienne plus forte. Les essais ont été répétés deux fois en triplicata, et les valeurs moyennes sont présentées dans les **Tableaux 14** et **15**.

La CMI de nos HES a été évaluée par la méthode de microdilution en bouillon, utilisant des microplaques stériles à 96 puits remplies de 95 µL de milieu de culture et de 5 µL de suspension bactérienne, avec un étalon de turbidité de McFarland 0,5, le tout mélangé avec 100 µL d'huile essentielle à différentes concentrations.

Une analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) a été réalisée pour examiner l'influence de la concentration des HES et des souches bactériennes sur la zone d'inhibition. Les lettres en exposants suivant les valeurs moyennes indiquent des différences statistiques entre les groupes, comme déterminé par le test de Student–Neuman–Keuls ($P < 0.05$).

III.1. *Pinus nigra* sp. *mauretanica*

Le **Tableau 14** présente des données sur l'activité antibactérienne des HES de *P. nigra* et de l'ampicilline utilisée comme témoin contre différentes souches bactériennes. On remarque nettement que l'efficacité varie en fonction de l'organe (aiguilles, branches, cônes) et de la souche bactérienne testée. Pour la souche *Dickeya dadantii*, on observe que les DZI varient de 7,31 mm à 13,77 mm en fonction de la dilution et de l'organe de la plante. La souche *Dickeya solani* montre également des différences notables, avec des DZI allant de 7,86 mm à 12,22 mm. Enfin, la souche *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* présente des DZI allant de 6,79 mm à 14,46 mm. Relativement, les HES extraites des branches à la concentration la plus élevée (dilution 1/2) montrent les plus grandes activités antibactériennes (entre 12,22 et 13,77).

Cependant la plus grande valeur (14.46 ± 3.37) est enregistrée chez les cônes à une dilution de 1/2.

L'ampicilline, le témoin positif, a montré une activité inhibitrice cohérente contre toutes les souches testées et elle a également présenté les niveaux d'inhibition les plus élevés (entre 30,79 et 33,06). L'activité des HEs est dépendante de la concentration, ce qui signifie que plus la concentration est élevée, plus l'effet antibactérien est important.

Selon les références ci-après, la sensibilité des souches est en général (+). La sensibilité aux différentes huiles a été classée en fonction du diamètre des halos d'inhibition: non sensible (-) pour les diamètres inférieurs à 8 mm ; sensible (+) pour les diamètres de 9 à 14 mm ; très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres supérieurs à 20 mm ([Duraffourd et al., 1990](#) ; [Ponce et al., 2003](#)).

Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Tableau 14 : Activités antibactériennes (diamètre des zones d'inhibition) des HES de *P. nigra* et de l'ampicilline (antibiotique de référence).

Organe / Antibiotique	Aiguilles			Branches			Cones			Antibiotique
	Diamètreredelazoned'inhibition									
Dilution (v/v) Souche	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	
<i>Dickeyadadantii</i>	10,161 ^{cde} ± 1,5	8,91 ^{def} ± 0,78	7,50 ^{ef} ± 0,4	13,77 ^{ab} ± 1,48	11,33 ^{bcd} ± 1,4	7,48 ^{ef} ± 0,08	8,52 ^{def} ± 1,12	7,36 ^{ef} ± 0,5	7,31 ^{ef} ± 0,8	31,15 ± 1,5
<i>Dickeyasolani</i>	9,41 ^{cdef} ± 1,53	9,45 ^{cdef} ± 1,25	7,81 ^{ef} ± 0,63	12,22 ^{abc} ± 2,93	8,71 ^{def} ± 1,00	7,75 ^{ef} ± 0,33	9,82 ^{cdef} ± 0,36	8,72 ^{ef} ± 0,75	7,86 ^{ef} ± 0,68	30,79 ± 1,3
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i>	7,04 ^f ±0,48	8,3 ^{ef} ± 1,12	7,2 ^{def} ± 0,6	12,25 ^{abc} ± 1,32	8,23 ^{ef} ± 1,31	7,26 ^f ± 0,7	14,46 ^a ± 3,37	6,79 ^f ± 0,72	7.89 ^{ef} ± 0,77	33,06 ± 1,9

Diamètre de la zone d'inhibition (DZI) : les valeurs comprennent le diamètre du disque (6 mm). L'ampicilline a été utilisée comme témoin positif. Les valeurs ont été exprimées en moyenne, où toutes les expériences ont été répétées deux fois en triplicata. Les valeurs moyennes dans les colonnes suivies de lettres en exposant différents montrent une différence statistique selon le test de Student-Neuman-Keuls ($p < 0,05$).

Les CMI des HEs de *P. nigra* varient en fonction des parties de la plante et des souches bactériennes testées (**Tableau 15**). Pour les aiguilles et les branches, aucune efficacité significative n'a été observée contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya dadantii* et *Dickeya solani*, avec des CMI supérieures à 2 mg/mL. Toutefois, les HEs semblent plus efficaces contre *Dickeya solani*, montrant une CMI égale ou inférieure à 2 mg/mL. Cette tendance se répète pour les cônes, où les HEs n'ont pas montré d'efficacité significative contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* et *Dickeya dadantii*, mais ont affiché une inhibition notable contre *Dickeya solani*, avec une CMI égale ou inférieure à 2 mg/mL.

Tableau 15 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles *P. nigra* contre les souches bactériennes testées.

Organe	Souches bactériennes	MIC (mg/mL)
Aiguilles	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CFBP 5387	>2
	<i>Dickeya dadantii</i> CFBP 3855	>2
	<i>Dickeya solani</i> CFBP 8199	>2
Branches	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CFBP 5387	>2
	<i>Dickeya dadantii</i> CFBP 3855	>2
	<i>Dickeya solani</i> CFBP 8199	≤ 2
Cônes	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CFBP 5387	>2
	<i>Dickeya dadantii</i> CFBP 3855	>2
	<i>Dickeya solani</i> CFBP 8199	≤ 2

La recherche sur l'activité antibactérienne contre les *Pectobacteriaceae*, une famille de bactéries responsables de maladies de pourriture des plantes, revêt une grande importance. Peu d'études se sont penchées sur les éventuelles propriétés antibactériennes des HEs contre les *Pectobacteriaceae*. Cependant, il convient de noter qu'il existe un certain nombre d'études qui se sont concentrées sur les propriétés antibactériennes vis-à-vis de certaines bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*. Pour illustrer ce point, l'étude menée par [Elaissi et al. \(2012\)](#) a évalué l'activité antibactérienne de 15 HEs d'*Eucalyptus* contre des souches de référence

d'Enterobacteriaceae, notamment *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*. Les chercheurs ont utilisé la méthode de diffusion sur disque et ont constaté que plusieurs HEs d'Eucalyptus présentaient une activité antibactérienne contre ces souches (Elaissi et al., 2012).

Il est essentiel de souligner que les recherches spécifiquement axées sur l'activité antibactérienne des HEs contre *Dickeya dadantii*, *Dickeya solani* et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* sont encore plus rares. De plus, peu d'études ont ciblé *P. nigra* sp. *mauretanica*, en raison de sa distribution géographique limitée en tant qu'espèce endémique.

Les résultats de l'étude révèlent plusieurs tendances significatives. Tout d'abord, l'activité antibactérienne des HEs est clairement dépendante de la concentration, avec une augmentation de l'efficacité à mesure que la concentration augmente. La sensibilité des souches bactériennes aux différentes HEs est en général positive, comme indiqué par les DZI.

Il est important de noter que l'efficacité des HEs varie en fonction de l'organe d'origine (aiguilles, branches, cônes) ainsi que de la souche bactérienne testée. Les HEs provenant des branches présentent une activité antibactérienne plus marquée à la dilution la plus élevée (1/2), ce qui suggère la présence de composés particulièrement efficaces dans les branches.

La composition chimique des HEs de *P. nigra* varie considérablement en fonction de la partie de la plante (aiguilles, branches, cônes). Les composés tels que l' α -pinène, le (E)- β -caryophyllène et le β -pinène montrent des variations notables, ce qui peut avoir un impact sur les propriétés et les applications des HEs extraites de différentes parties de la plante.

En ce qui concerne l' α -pinène, les résultats indiquent qu'il est prédominant dans les cônes (58,1%) et les branches (55,7%), tandis qu'il est présent en quantité moindre dans les aiguilles (9,4 %).

Hormis les proportions relatives en α -pinène, certaines études menées sur les effets antimicrobiens et antipaludiques d' α -et β -pinène ont révélé des résultats intéressants. En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, il a été démontré que le (+)- β -pinène possède une activité environ 2 à 12 fois plus élevée que le (+)- α -pinène contre diverses souches bactériennes, notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et la levure *Candida albicans* (Van Zyl et al., 2006). Cette activité antimicrobienne a été attribuée à la capacité d' α -et β -pinène de perturber l'intégrité cellulaire de ces micro-organismes, ce qui les rend efficaces

contre un large éventail de bactéries à la fois Gram positif et Gram négatif, ainsi que *Candida albicans*.

De plus, l'effet antimicrobienned'énantiomères d' α -et β -pinène a été étudié par [Silva et al. \(2012\)](#). Ces énantiomères ont montré des valeurs de CMI allant de 117 à 6250 $\mu\text{g/mL}$ contre divers micro-organismes, notamment *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus oryzae*, et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) ([Silva et al., 2012](#)). Les énantiomères positifs ont montré une capacité élevée à éliminer 100% de *Candida albicans* en 60 minutes, tandis que MRSA nécessitait 6 heures pour être totalement éliminé.

D'autres dérivés de α -pinène ont également été évalués, montrant que le (+)- α -pinène avait une action modérée contre certaines bactéries, tandis que d'autres dérivés (tels que les β -lactames, les esters aminés et les alcools aminés) présentaient des propriétés antimicrobiennes significatives ([Dhar et al, 2014](#)). Il est intéressant de noter que les énantiomères négatifs d' α -pinène ne présentaient aucune activité antimicrobienne.

En ce qui concerne les cônes, les résultats sont plus variables. La dilution 1/2 montre une forte activité contre la souche *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*, tandis que la dilution 1/5 présente la plus faible activité contre toutes les huiles essentielles. Cette variation souligne l'importance de la concentration dans l'efficacité des HEs extraites des cônes.

L'analyse des CMI présentées dans le **Tableau 16** révèle des distinctions qualitatives et quantitatives marquées entre les HEs extraites des trois parties de *P. nigra*. Ces observations mettent en lumière le potentiel significatif des HEs tant qu'agents antibactériens, notamment celles provenant des branches et des cônes. Les HEs de *P. nigra* semblent avoir une efficacité limitée contre les souches de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* et *Dickeya dadantii*, en particulier lorsqu'elles sont extraites des aiguilles et des branches. Cependant, elles semblent plus efficaces contre *Dickeya solani*, en particulier à partir des cônes, avec une CMI égale ou inférieure à 2 mg/mL. Ces résultats indiquent une variabilité dans l'activité inhibitrice en fonction des parties de la plante et des souches bactériennes.

III.2. *Abies numidica*

Le **Tableau 16** présente des données sur l'activité antibactérienne des HEs d'*A. numidica* et de l'ampicilline, utilisée comme témoin, contre différentes souches bactériennes.

Les aiguilles, les branches et les cônes d'*A. numidica* ont tous montré une activité antibactérienne contre les souches bactériennes testées. Les résultats des essais antibactériens

ont montré que l'efficacité des HEs d'*A. numidica* variaient en fonction de l'organe de la plante et de la souche bactérienne. Pour la souche *Dickeya dadantii*, on observe que les DZI varient de 6,35 mm à 12,55 mm en fonction de la dilution et de l'organe de la plante. La souche *Dickeya solani* montre également des différences notables, avec des DZI allant de 7,25 mm à 15,99 mm. Enfin, la souche *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* présente des DZI allant de 6,57 mm à 13,19 mm.

Pour *Dickeya dadantii*, l'activité antibactérienne la plus forte a été observée avec les aiguilles ($12,55 \pm 4,92$) et cônes ($12,39 \pm 1,56$) à des concentrations de 1/2. *Dickeya solani* a montré la plus grande sensibilité aux branches à une concentration de 1/2 ($15,99 \pm 5,76$). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a présenté une sensibilité significative aux cônes à une concentration de 1/2 ($13,19 \pm 0,51$). L'ampicilline, utilisée comme contrôle positif, a démontré une constante capacité inhibitrice (entre 30,79 et 33,06) envers toutes les souches examinées et a également affiché le degré d'inhibition le plus élevé. L'activité des HEs est dépendante de la concentration, ce qui signifie que plus la concentration est élevée, l'effet antibactérien est plus important.

Selon les références ci-après, la sensibilité des souches est en général (+). La sensibilité aux différentes huiles a été classée en fonction du diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètres inférieurs à 8 mm ; sensible (+) pour les diamètres de 9 à 14 mm ; très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres supérieurs à 20 mm (Duraffourd et al., 1990 ; Ponce et al., 2003).

Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Tableau 16 : Activités antibactériennes (diamètre des zones d'inhibition) des HES d'*A. numidica* et de l'ampicilline (antibiotique de référence).

Organe / Antibiotique	Aiguilles			Branches			Cones			Antibiotique
	Diamètre de la zone d'inhibition									
Dilution (v/v) Souche	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	
<i>Dickeya dadantii</i>	12,55 ^{abc} ± 4,92	8,69 ^{cdef} ± 2,60	6,65 ^f ± 0,48	8,99 ^{cdef} ± 2,04	7,003 ^f ± 0,71	6,35 ^f ± 0,69	12,39 ^{abcd} ± 1,56	8,47 ^{def} ± 0,7	7,53 ^{ef} ± 0,59	31,15 ± 1,5
<i>Dickeya solani</i>	7,39 ^f ± 0,23	8,35 ^{ef} ± 1,18	7,89 ^{ef} ± 0,81	15,99 ^a ± 5,76	7,63 ^{ef} ± 0,38	6,68 ^f ± 0,1	11,46 ^{bcde} ± 1,76	8,17 ^{ef} ± 0,46	7,25 ^f ± 0,49	30,79 ± 1,3
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp <i>carotovorum</i>	9,99 ^{bcdef} ± 1,09	6,73 ^f ± 0,59	6,57 ^f ± 0,48	8,55 ^{cdef} ± 0,94	8,54 ^{def} ± 1,46	7.32 ^f ± 0.32	13,19 ^{ab} ± 0,51	8,24 ^{ef} ± 0,84	6,78 ^f ± 0,62	33,06 ± 1,9

Diamètre de la zone d'inhibition (DZI): les valeurs comprennent le diamètre du disque (6mm). L'ampicilline a été utilisée comme témoin positif.

Les valeurs sont exprimées en moyenne, où toutes les expériences ont été répétées deux fois en triplicata. Les valeurs moyennes dans les colonnes suivies de lettres en exposant différents montrent une différence statistique selon le test de Student-Neuman-Keuls ($p < 0,05$).

Le **Tableau 17** présente les CMI des huiles HEs d'*A. numidica* contre différentes souches bactériennes. Pour les aiguilles, aucune efficacité significative n'a été observée contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* et *Dickeya dadantii*, avec des CMI supérieures à 2 mg/mL. Les branches montrent une tendance similaire, avec une faible inhibition de la croissance bactérienne contre ces mêmes souches. En ce qui concerne les cônes, les HEs ne sont pas efficaces contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* et *Dickeya dadantii*, indiquant une absence d'inhibition significative. Cependant, il est important de noter que contre *Dickeya solani*, les cônes montrent une inhibition significative, avec une CMI égale ou inférieure à 1 mg/mL.

Tableau 17 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles d'*A. numidica* contre les souches bactériennes testées.

Organes	Souches bactériennes	MIC (mg/mL)
Aiguilles	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CFBP 5387	>2
	<i>Dickeya dadantii</i> CFBP 3855	>2
	<i>Dickeya solani</i> CFBP 8199	>2
Branches	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CFBP 5387	>2
	<i>Dickeya dadantii</i> CFBP 3855	>2
	<i>Dickeya solani</i> CFBP 8199	≤2
Cônes	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> CFBP 5387	>2
	<i>Dickeya dadantii</i> CFBP 3855	>2
	<i>Dickeya solani</i> CFBP 8199	≤ 1

Les données du tableau précédent indiquent une activité antibactérienne dépendante de la concentration pour presque toutes les HEs. Les niveaux d'activité antibactérienne varient en relation avec l'organe de la plante (aiguilles, branches, cônes) et la souche bactérienne considérée. De manière notable, les HEs extraites des branches à une concentration de ½ ont démontré relativement une plus grande efficacité contre *Dickeya solani*.

Ces HEs, caractérisées par une composition dominée par l' α -pinène à hauteur de 59.7% et le β -pinène à 12.9%, ainsi que la présence notable du limonène à 10.0%, pourraient être à l'origine de cette activité.

Il convient de noter que certaines études ont mis en lumière que l'efficacité des HEs peut être liée à la nature de leurs énantiomères, qu'ils soient positifs ou négatifs. À titre d'exemple, les activités antimicrobiennes des isomères et énantiomères du pinène ont été évaluées contre diverses cellules bactériennes et fongiques, dont *Candida albicans*, *Candida neoformans* et *Rhizopus oryzae*. Les tests de diffusion en agar ont révélé que seuls les énantiomères positifs des isomères α et β du pinène présentaient une activité antimicrobienne, tandis que les énantiomères négatifs ne manifestaient aucune efficacité antimicrobienne, même à des concentrations élevées atteignant 20 mg/mL (Silva et al., 2012). Ce point a été souligné plus en détails dans la section précédente relative à *Pinus nigra* sp. *mauretanica*.

L'étude menée par Abbaci et al. (2023), a révélé que les HEs extraites des branches ont manifesté une activité particulièrement prononcée à une concentration de $\frac{1}{2}$, en particulier à l'encontre de la souche *Dickeya solani*. Cette recherche a porté sur les parties aériennes d'*Eucalyptus gunnii*, à partir desquelles les HEs ont été obtenues par hydro-distillation.

Les HEs extraites d'*Eucalyptus gunnii* ont démontré une activité antibactérienne notablement plus marquée à l'égard des souches de *Dickeya solani* que par rapport aux autres souches étudiées, à savoir *Dickeya dadantii* et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Ces résultats sont en concordance avec notre étude et mettent en lumière la sensibilité de *Dickeya solani* aux extraits des HEs provenant de taxons différents et aux profils chimiques différents. Les constituants principaux des HEs d'*Eucalyptus gunnii* ont été identifiés comme étant le 1,8-cinéol, l'acétate de α -terpinyle, l'*o*-cymène et l' α -terpinéol.

Les profils chimiques au sein de l'*A. numidica* varient considérablement d'une partie à l'autre de la plante. À titre d'exemple, les branches contiennent une proportion significative d' α -pinène, atteignant 59,7 %. Cependant, il est intéressant de noter que ce sont les cônes qui se sont révélés plus réactifs face à l'ensemble des bactéries.

Des études antérieures ont montré que les terpènes oxygénés, des composés dérivés des terpènes et contenant des atomes d'oxygène, présentent une activité antibactérienne plus efficace que les terpènes hydrocarbonés (Allenspach & Valder, 2020). D'autres recherches ont

démontré que les HEs riches en terpènes oxygénés tels que le carvacrol, le p-cymène, le γ -terpinène et le thymol exercent une forte activité antimicrobienne (Yousefzadi et al., 2013).

En effet, malgré la valeur maximale enregistrée pour les branches ($15,99 \pm 5,76$) contre *Dickeya solani*, l'HE des cônes s'est révélée plus active contre l'ensemble des bactéries. Cette huile est riche en monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés.

En analysant les CMI (Tableau 17), les HEs d'*A. numidica* semblent avoir une efficacité relativement limitée contre les souches de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* et *Dickeya dadantii*, en particulier à partir des aiguilles et des branches. Cependant, elles semblent plus efficaces contre *Dickeya solani*, en particulier lorsqu'elles sont extraites des cônes, avec une CMI égale ou inférieure à 1 mg/mL. Ces résultats indiquent une variabilité dans l'activité inhibitrice en fonction des parties de la plante et des souches bactériennes testées. Cela peut s'expliquer en premier lieu par les variations des profils chimiques entre les différentes parties de l'*A. numidica*. Par exemple, les cônes présentent une composition différente des branches avec une richesse notable en limonène, qui constitue 40.7% de la composition totale de l'huile, relativement supérieur à l' α -pinène (25.3%) et le β -pinène (5.6%).

En conclusion, nous avons adopté une approche consistant à tester trois parties distinctes de chaque plante pour mieux comprendre les propriétés uniques de ces parties. Il est important de noter que peu d'études se sont concentrées sur trois organes différents, à savoir les feuilles, les rameaux et les cônes.

De plus, en raison du manque d'études sur les activités antibactériennes des HEs contre *Dickeya dadantii*, *Dickeya solani* et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, nous disposons d'un nombre limité de références pour étayer notre argumentation. Les espèces endémiques comme *P. nigra* et *A. numidica*, ayant une distribution géographique limitée, ont rarement été étudiées en ce qui concerne leurs activités biologiques, ce qui explique la rareté des données disponibles.

Pour résumer, les deux études ont mis en évidence le potentiel des HEs en tant qu'agents antibactériens, tout en soulignant l'importance significative de l'organe de la plante et de la concentration sur leur efficacité. Il est impératif de poursuivre des recherches approfondies pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces variations d'activité au sein des deux espèces. Les futures études contribueront à éclairer davantage les facteurs moléculaires et

chimiques influençant les propriétés antibactériennes des HEs extraites des différentes parties des plantes.

Il est important de souligner que l'objectif de notre étude n'était pas de comparer directement les deux plantes, mais plutôt d'analyser les variations de l'activité des différentes parties à l'intérieur de chaque espèce.

En comparant les résultats des deux études sur les HEs de *P. nigra* sp. *mauretanica* et d'*A. numidica*, plusieurs similitudes et différences émergent.

Concernant les similitudes, les deux études mettent en évidence la variabilité de l'activité antibactérienne des HEs en fonction de l'organe de la plante. Dans les deux cas, les aiguilles, les branches et les cônes montrent des activités antibactériennes variables. Les HEs d'*A. numidica* et de *P. nigra* ont des activités antibactériennes dépendantes de la concentration, montrant une augmentation de l'effet antibactérien à mesure que la concentration des HEs augmente. L'ampicilline, utilisée comme témoin positif, a montré une activité inhibitrice constante et la plus élevée dans l'étude.

Les HEs extraites des branches et des cônes, à la concentration la plus élevée (dilution 1/2), présentent les niveaux les plus élevés d'activité antibactérienne dans les deux espèces. En revanche, les HEs extraites des feuilles semblent être les moins efficaces.

Concernant les différences, les HEs de *P. nigra* montrent une plus grande variabilité dans leurs activités antibactériennes, avec des diamètres de zones d'inhibition (DZI) variant en fonction de la souche bactérienne testée, de la dilution et de l'organe d'origine.

Les HEs d'*A. numidica* semblent être plus efficaces contre la souche *Dickeya solani*, en particulier lorsqu'elles sont extraites des cônes, avec une CMI égale ou inférieure à 1 mg/mL. En revanche, les HEs de *P. nigra* montrent une CMI supérieure à 2 mg/mL contre cette souche.

Avant d'émettre une conclusion à notre étude, il est essentiel de rappeler que les activités biologiques ou chimiques d'une plante résultent souvent de la combinaison de plusieurs composés plutôt que d'un seul. Plusieurs auteurs ont discuté de l'activité antibactérienne des HEs en mettant en avant leur diversité moléculaire, permettant ainsi des interactions complexes entre les différents composés présents dans la plante.

IV. Activités antifongiques des Huiles Essentielles de *P.nigra* et *A.numidica*

L'investigation de l'activité biologique des HEs vis-à-vis de l'inhibition de la croissance fongique de trois (03) espèces de champignons phytopathogènes de différentes espèces cultivées, est faite dans des conditions *in vitro* en ayant recours à la technique d'incorporation de l'huile dans le milieu de culture décrite par **Grover & Moore, 1962** et modifiée par **Cakir et al. 2004**. L'évaluation de l'inhibition a été faite en mesurant le diamètre moyen des colonies fongiques, après 7 jours d'incubation à 25°C et à l'obscurité, au travers du fond extérieur des boîtes suivant deux directions perpendiculaires et constantes.

Les résultats (**Tableaux 18** et **19**) de l'efficacité de chaque huile essentielle ont été déterminés à partir du taux d'inhibition calculé par rapport au diamètre moyen des témoins (les témoins consistent en des colonies en croissance sur des milieux ne contenant pas d'huile essentielle).

Tableau 18 : Activité antifongiques des HES des différents organes de *P.nigra*.

Espèces	Aiguilles	Branches	Cônes	Actidione
—	Inhibition(%)			
<i>Botrytis cinerea</i>	20,24 ^{EF}	17,26 ^F	19,05 ^{EF}	100 ^A
	± 1.19	± 1.79	± 3.57	± 0.00
<i>Muccor</i> sp.	19,69 ^{EF}	14,09 ^F	17,46 ^F	100 ^A
	± 4.68	± 4.31	± 5.37	± 0.00
<i>Alternaria</i> sp.	27,73 ^{DE}	29,22 ^D	50,40 ^C	82,34 ^B
	± 5.32	± 1.5	± 1.82	± 3.28

*** Les valeurs sont des moyennes ± écarts-types (n=3);

*** Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Tableau 19: Activité antifongique des HES des différents organes d'*A. numidica*.

Espèces	Aiguilles (4µL/mL)	Branches (4µL/mL)	Cônes (4µL/mL)	Actidione
	Inhibition(%)			
<i>Botrytis cinerea</i>	42,66 ^G ± 8.04	31,75 ^H ± 10.18	61,51 ^{DE} ± 2.25	100 ^A ± 0.00
<i>Mucor</i> sp.	56,15 ^{EF} ± 1.91	52,78 ^F ± 4.81	55,36 ^{EF} ± 3.31	100 ^A ± 0.00
<i>Alternaria</i> sp.	70,24 ^C ± 1.19	65,48 ^{CD} ± 1.19	67,46 ^{CD} ± 0.69	82,34 ^B ± 3.28

***Les valeurs sont des moyennes ± écarts-types (n=3);

*** Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Les résultats expérimentaux montrent une activité antifongique significative ($P < 0,05$) des HEs extraites de deux espèces de Pinaceae. L'efficacité antifongique varie en fonction de l'espèce fongique cible et de l'organe végétal source des HEs.

Les HEs d'*A. numidica* exhibent une capacité d'inhibition supérieure face à celles de *P. nigra*, avec une action inhibitrice particulièrement notable des HEs issues des aiguilles et des cônes contre *Botrytis cinerea* et *Mucor* sp., tandis que les HEs des branches sont plus actives contre *Alternaria* sp.

Cette activité inhibitrice est amplifiée, en particulier, chez *A. numidica*, où une réduction significative de la croissance fongique est observée comparativement au témoin.

Alternaria sp. se révèle particulièrement sensible aux HEs des deux Pinaceae étudiées, avec des taux d'inhibition allant de 31,75% à 70,24%, soulignant une efficacité notablement accrue par rapport à *P. nigra*. Les HEs issues des cônes de *P. nigra*, en particulier, ont entraîné une diminution de 50 % de la croissance d'*Alternaria* sp., tandis que les HEs provenant d'autres parties de la plante ont montré une efficacité moindre, avec des taux d'inhibition ne dépassant généralement pas 30 %.

Ces observations suggèrent une sensibilité différentielle des champignons testés aux HEs, en fonction de la concentration utilisée et de la source botanique, mettant en évidence le potentiel des HEs, en particulier celles d'*A. numidica*, comme agents antifongiques ciblés.

L'hétérogénéité observée dans l'efficacité antifongique des HEs peut être attribuée non seulement à la matrice végétale d'origine et à la souche fongique ciblée, mais également à la composition chimique des HEs.

Les HEs analysées dans cette étude se caractérisent par une teneur élevée en composés terpéniques, dont l'activité antifongique est susceptible d'être modulée par les groupes fonctionnels chimiques qu'elles contiennent. De plus, le chémotype spécifique de l'organe source pourrait jouer un rôle déterminant dans le profil d'activité antifongique des HEs. Cette corrélation suggère que la composition chimique intrinsèque des HEs est un facteur clé influençant leur potentiel antifongique.

La corrélation entre la composition chimiotypique des HEs et leur efficacité antifongique est mise en évidence par les résultats de cette étude. Il convient de signaler que les variations des profils chimiques, spécifiques à chaque organe végétal, influencent directement l'activité biocide des HEs. Les données acquises révèlent que la variation enregistrée dans l'efficacité antifongique est concomitante avec la diversité des molécules constituant les chimiotypes de chaque organe. Cette relation souligne l'importance de la composition qualitative et quantitative des composés chimiques dans la modulation de l'activité antifongique des HEs.

Plusieurs études ont rapporté des différences dans l'efficacité antifongique des HEs des différents organes de la même plante. [Khedhri et al., \(2022\)](#) ont mis en évidence la variation de la réduction de la croissance de cinq espèces de champignons phytopathogènes par les huiles des organes aériens de *P. pinaster*. Les HEs des cônes assurent une inhibition jusqu'à 40% des espèces fongiques testées. En revanche, le pourcentage d'inhibition de croissance le plus faible de toutes les espèces fongiques étudiées a été obtenu avec les huiles de branches qui présentaient une faible quantité de monoterpènes hydrocarbonés.

Les études menées par [Amri et al. \(2011 ; 2012 ; 2013\)](#) sur différentes espèces de pin ont mis en évidence le pouvoir antifongique des composés terpéniques et en particulier les classes de mono et sesquiterpènes. Les mêmes conclusions ont été faites par [Hanana et al. \(2014\)](#), en étudiant l'activité antifongique des HEs de trois espèces du genre *Pinus* introduites en Tunisie.

Dans toutes ces études, il convient de signaler le rôle des terpènes hydrocarbonés et leurs dérivés oxygénés dans la réduction et/ou l'inhibition complète de la croissance fongique. Les monoterpènes hydrocarbonés qui sont des composés apolaires doués d'un grand pouvoir pénétrant ont donc la possibilité de traverser les membranes cellulaires en établissant des pores,

altérant ainsi l'intégrité et la fluidité membranaire par l'insertion des monoterpènes entre les acides gras de la bicouche lipidique membranaire, perturbant par conséquent les fonctions cellulaires (Sharma & Tripathi, 2008). Il semblerait que les terpènes exercent un dysfonctionnement des pompes à protons ATPase pouvant conduire à la mort cellulaire (Cakir *et al.*, 2004; Lucini *et al.*, 2006; Cristani *et al.*, 2007). Par ailleurs, Changa *et al.* (2008) ont montré que l'activité antifongique des sesquiterpènes est supérieure à celle des monoterpènes; or, les teneurs en sesquiterpènes de nos huiles essentielles sont inférieures aux monoterpènes, excepté les huiles des aiguilles de *P. nigra*, expliquant ainsi le fait qu'on n'ait pas obtenu une inhibition totale de la croissance des champignons. On conclut alors que l'activité antifongique de ces huiles essentielles est due à la présence à la fois de sesquiterpènes et de monoterpènes et à la synergie entre ces composants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abbaci H., Nabti E-H., Al-Bekairi A-M., Hagra SA. A., Salem-Bekhit M-M., Adjaoud A., Alzahrani H.A., Bensidhoum L., Alenazy R., Piras A., Falconieri D., Porcedda S., Benguerba Y. and Houali K. (2023). Comparative Bioactivity Evaluation of Chemically Characterized Essential Oils Obtained from Different Aerial Parts of *Eucalyptus gunnii* Hook.f. (Myrtaceae). *Molecules*, 28 (6), 2638.
2. Allenspach M.D., Valder C. and Steuer C. (2020). Absolute quantification of terpenes in conifer-derived essential oils and their antibacterial activity. *Journal of Analytical Science and Technology*, 11(1), 1-10.
3. Amri I., Hamrouni L., Gargouri S., Hanana M., Mahfoudhi M., Fezzani T., Ferjani E. and Jamoussi B. (2011). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Pinus patula*. *Natural Product Communications*, 6, 1531-1536.
4. Amri I., Gargouri S., Hamrouni L., Hanana M., Fezzan, T. and Jamoussi, B. (2012). Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, 85, 199–207.
5. Amri I., Hamrouni L., Hanana M., Gargouri S., Fezzani T. and Jamoussi B., (2013). Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological Agriculture & Horticulture*, 29, 91–106.
6. Hanana M., Bejia A., Amri I., Gargouri S., Jamoussi B. and Hamrouni L. (2014). Activités biologiques des huiles essentielles de pins. *Journal of New Sciences*, 4 (3), 18-32.
7. Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S. and Hirata T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour Fragrance*, 19, 62-68.
8. Changa HT., Cheng YH., Wua CL., Chang ST. and Tun-Tschu CY. (2008) Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technology*, 99, 6266-6270.
9. Cristani M., Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro MG., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A. and Trombetta D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 6300-6308.
10. Dhar P., Chan PY., Cohen D. T., Khawam F., Gibbons S., Snyder-Leiby T., Dickstein E., Kumar Rai P. and Watal G. (2014). Synthesis, antimicrobial evaluation, and structure–activity

relationship of α -pinene derivatives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (16), 3548-3552.

11. Duraffourd C., D'Hervicourt L. and Lappraz J.C. (1990). Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Éléments thérapeutiques synergiques. 2^{ème} édition Masson (Paris), 87 pp.

12. Elaissi A., Rouis Z., Mabrouk S., Bel Haj Salah K., Aouni M., Larbi Khouja M., Farhat F., Chemli R. and Harzallah-Skhiri F. (2012). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from fifteen *Eucalyptus* species growing in the Korbous and Jbel Abderrahman arboreta (North East Tunisia). *Molecules*, 17 (3), 3044-3057.

13. Grover R.K. & Moore J.D. (1962). Toximetric studies of fungicides against brown rot organism: *S. fructicola* and *S. laxa*. *Phytopathology*, 52, 876–880.

14. Khedhri S., Khammassi M., Amri I., Mabrouk Y., Fergeni Dh., Gargouri S., Hanana M., Jamoussi B. and Hamrouni L. (2022). Phytochemical studies on essential oils of *Pinus pinaster* Aiton and evaluation of their biological activities. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 8 (2), 75-98.

15. Lucini E.I., Zunino M.P., Lopez M.L. and Zygodlo J.A. (2006). Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*, 154, 441–6

16. Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., and Roura S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36 (7), 679-684.

17. Sharma N. & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological research*, 163 (3), 337-344.

18. Silva A.C.R. da, Lopes, P.M., Azevedo M.M.B. de, Costa D.C.M., Alviano C.S. and Alviano D.S. (2012). Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 17 (6), 6305–6316.

19. Van Zyl R.L., Seatholo S.T., Van Vuuren S.F. and Viljoen A.M. (2006). The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 18 (sup1), 129-133.

20. Yousefzadi M., Riahi-Madvar A., Hadian J., Rezaee F., Rafiee R. and Biniiaz M. (2013). Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: in vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. *Journal of Immunotoxicology*, 11 (1), 50-55.

Activités insecticides

V. Évaluation de l'activité insecticide des huiles essentielles sur

Callosobruchus maculatus (F)

V.1. Évaluation de l'effet par contact des huiles essentielles sur *C. maculatus*

Les résultats obtenus révèlent que les HEs testées ont montré une activité insecticide variable en fonction de l'espèce, de l'organe étudié et de la dose d'huile appliquée sur les adultes de *C. maculatus* (**Figure 44 et annexe I**). Pour *P. nigra*, les taux de mortalité varient de 33 à 47 % pour les aiguilles, de 34 à 48 % pour les branches et de 35 à 47 % pour les cônes. À la dose la plus élevée, les HEs ont provoqué une forte mortalité, dépassant 50 % de la population testée. Les HEs se sont révélées toxiques pour les adultes de *C. maculatus* après quatre jours d'exposition, mais à des doses différentes. L'HE la plus efficace était celle des aiguilles, qui à la dose la plus faible (2 µL/mL), a entraîné une mortalité de 48.75 % des adultes de *C. maculatus*, tandis que pour les branches et les cônes, ce taux a été atteint à une concentration beaucoup plus élevée (8 µL/mL). En somme, l'efficacité insecticide des HEs varie en fonction de la partie de la plante utilisée et de la concentration de l'huile, soulignant l'importance de ces facteurs dans l'utilisation des HEs comme insecticides.

Pour toutes les huiles testées, l'efficacité augmente avec la dose pulvérisée sur le substrat alimentaire du ravageur. La différence d'effet de chaque huile est basée sur la comparaison des DL_{50}/TL_{50} (**Tableau 20**) qui montrent que parmi les HEs testées, l'HE des aiguilles est la plus efficace par effet contact à l'égard des adultes de la bruche de niébé.

Le modèle Probit-log nous permet de calculer la mortalité en termes de doses létales, accompagnées de leurs limites de confiance. La pente et le Khi^2 (χ^2) sont des indicateurs de la toxicité de l'huile essentielle (HE). Le Khi^2 , qui n'est pas significatif à 5 %, sert à tester l'adéquation du modèle. Les résultats obtenus montrent que l'HE extraite des aiguilles présente une dose létale 50 (DL_{50}) de 1.058 µL/mL, ce qui la rend 5 à 6 fois plus efficace que celle extraite des cônes (5.759 µL/mL) et des branches (6.235 µL/mL). De plus, son temps léthal 50 (TL_{50}) est deux fois plus court que celui des deux autres organes de *P. nigra*. Ces deux paramètres indiquent que l'huile essentielle extraite des aiguilles a une toxicité élevée par contact vis-à-vis de *C. maculatus*.

Les graphiques (**Figure 45: a, b, c et d**) montrant la variation des mortalités en fonction de la dose des HEs appliquée, tirées de trois parties d'*A. numidica*, indiquent une réduction significative de la longévité des adultes de *C. maculatus*. À la dose la plus faible (2 µL/mL), toutes les HEs ont réduit la longévité à des taux allant de 40.50 à 43.03 %. Au quatrième jour

de traitement à la dose la plus élevée (16 µL/mL), les taux de mortalité cumulés (**Annexe I**) montrent que toutes les HEs testées ont une forte activité adulticide, avec plus de 50 % des individus périssés suite à la pulvérisation des graines de niébé avec 4 µL/mL d'une solution acétonique de l'HE considérée.

Les doses létales (DL) nécessaires pour tuer les adultes de *C. maculatus* différaient entre l'huile essentielle des cônes et les deux autres parties d'*A. numidica*. La DL₅₀ de 3,88 µL mL⁻¹ et la DL₉₅ de 252.558 µL mL⁻¹ de l'HE des cônes étaient plus létales que celles des HEs d'aiguilles et de branches avec une DL₅₀ de 4.585 µL mL⁻¹ (DL₉₅=) et 4.889585 µL mL⁻¹ (DL₉₅=), respectivement. La pente de la courbe dose-mortalité pour l'HE des cônes était plus faible (0.907 ± 0.214) que pour les HEs des aiguilles (1.108 ± 0.217) et des branches (1.211 ± 0.219). Les valeurs élevées du chi-carré (χ^2) et les faibles valeurs de P ($< 0,05$) indiquent l'adéquation des données au modèle PROBIT pour l'estimation des courbes temps-mortalité (**Tableau 20**).

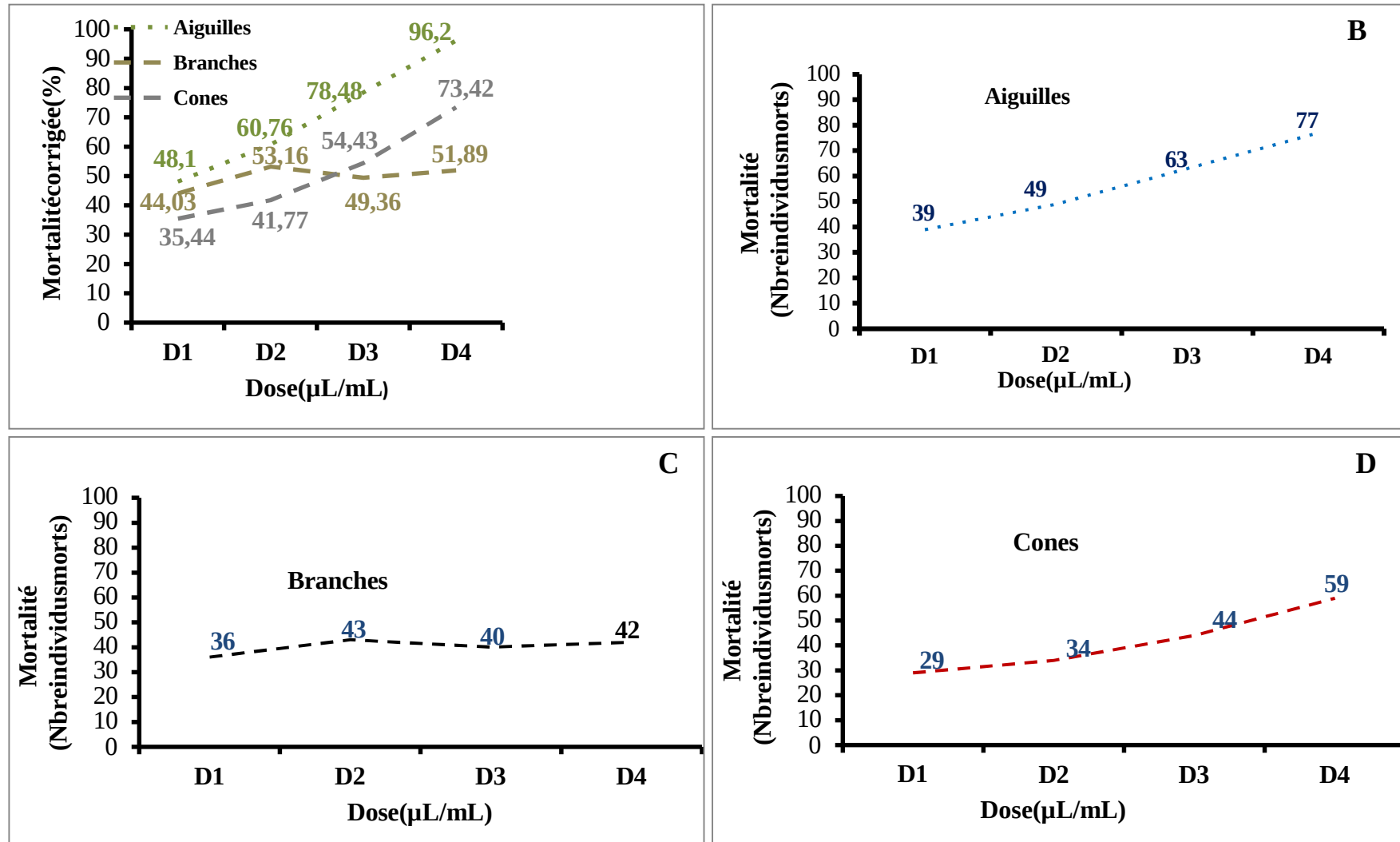


Figure 44: Variation de la mortalité chez les adultes de *C. maculatus* par contact, en fonction de la dose d'huiles essentielles de *P. nigra* appliquée, sur une durée de 4 jours.

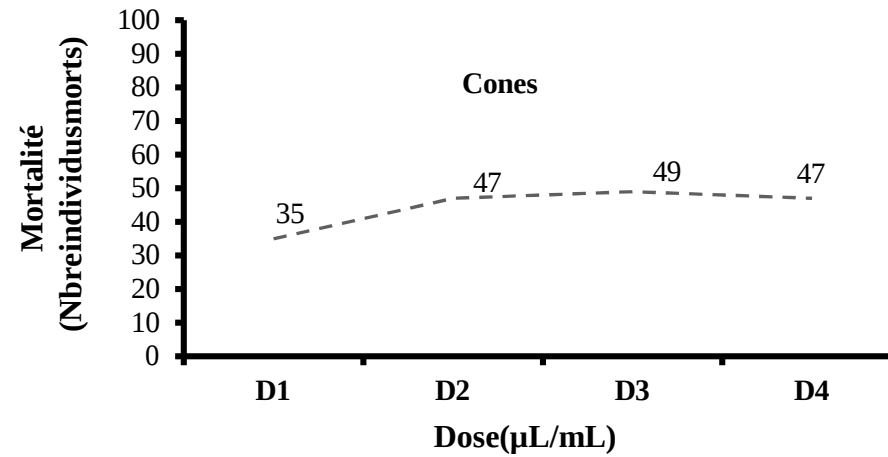
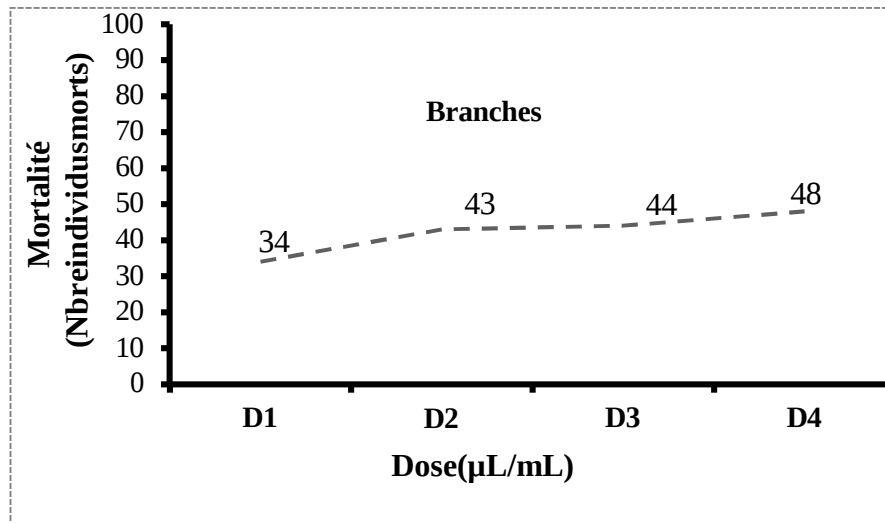
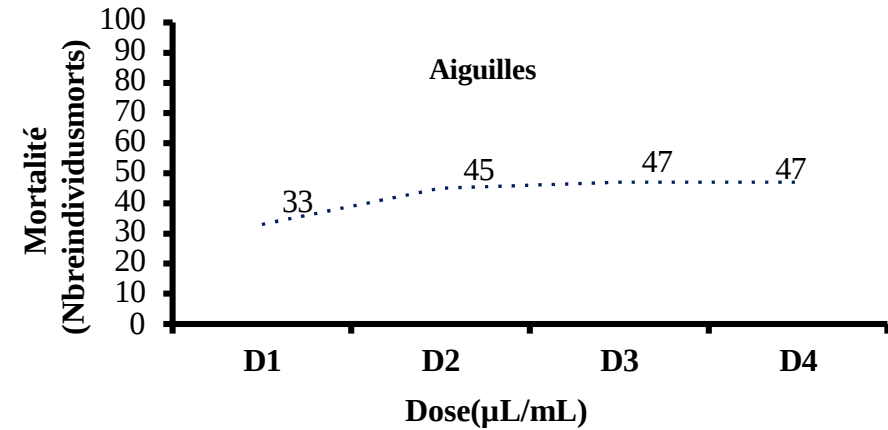
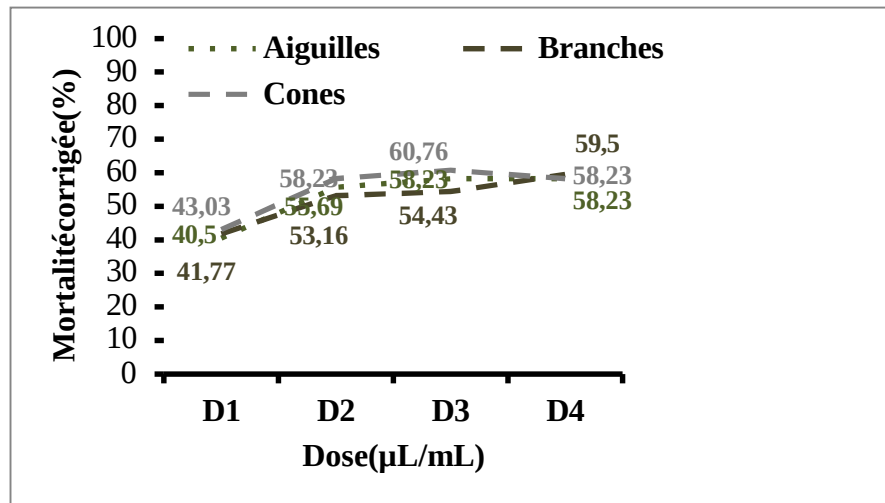


Figure 45: Variation de la mortalité chez les adultes de *C. maculatus* par contact, en fonction de la dose d'huiles essentielles d'*A. numidica* appliquée, sur une durée de 4 jours

Activité insecticide des huiles essentielles

Tableau 20 : Toxicité comparée (effet contact) des HE extraites des différentes parties de *P. nigra* et d' *A. numidica*.

Paramètres du modèle Probit							
Partie de la plante	DL ₅₀ (µL/mL) (min-max)	DL ₉₅ (µL/mL) (min-max)	χ^2	P	Interception	Pente ± Ecart type	TL50 (Heure) (min-max)
<i>P. nigra</i>							
Aiguilles	1.058 (0.211 – 1.933)	62.615 (25.712 – 778.910)	3.268	0.05	4.977	0.928 ± 0.234	53.738 (49.946 – 57.783)
Branches	6.235 (4.683 – 8.521)	156.253 (62.648 – 1086.932)	2.710	0.05	4.065	1.175 ± 0.218	104.364 (94.480 – 118.607)
Cônes	5.759 (4.006 – 8.343)	280.365 (83.629 – 5645.378)	0.662	0.05	4.258	0.974 ± 0.214	106.068 (95.117 – 122.304)
<i>A. numidica</i>							
Aiguilles	4.585 (3.194 – 6.164)	139.805 (55.119 – 1087.180)	0.171	0.05	4.267	1.108 ± 0.217	95.841 (87.398 – 107.604)
Branches	4.889 (3.582 – 6.431)	111.508 (49.196 – 598.221)	0.041	0.05	4.165	1.211 ± 0.219	97.759 (89.237 – 110.095)
Cônes	3.880 (2.240 – 5.539)	252.558 (72.491 – 7212.604)	0.295	0.05	4.465	0.907 ± 0.214	91.725 (83.746 – 102.721)

Les taux de mortalité observés et l'efficacité insecticide des huiles essentielles dans notre étude confirment les résultats d'autres chercheurs pour différentes huiles et pour le même ou d'autres insectes (ravageurs) de denrées stockées. Il est bien documenté que certaines plantes, sous forme d'huiles essentielles, ont un effet insecticide par contact sur *C. maculatus*. L'efficacité de ces huiles peut varier en fonction de la partie de la plante utilisée, ce qui est généralement attribué à leur composition chimique. Les trois huiles essentielles que nous avons étudiées sont particulièrement riches en composés terpéniques. Leur activité biocide pourrait être liée, et potentiellement influencée, par les groupes fonctionnels chimiques présents dans l'huile, ainsi que par le chémotype de la plante d'où elles proviennent (Séri-Kouassi, 2004 ; Ngamo et al., 2007 ; Nyamador, 2009). Ainsi, l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* a démontré une toxicité élevée par contact à une dose de 6.4 % (Tapondjou et al., 2003), causant une mortalité totale des six prédateurs des grains stockés (*Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis*, *Acanthoscelides obtecus*, *Sitophilus granarius*, *S. zeamais* et *Prostephanus truncatus*).

Plus tard, en 2005, Tapondjou et ses collaborateurs ont confirmé l'efficacité insecticide des HEs d'*Eucalyptus saligna* et de *Cupressus sempervirens* contre *S. zeamais* et *Tribolium confusum*. Ces huiles, lorsqu'elles sont appliquées sur des disques de papier filtre ou sur des grains de maïs, ont provoqué une mortalité significative des insectes testés. L'huile d'eucalyptus s'est avérée plus toxique que celle de cupressus pour les deux espèces d'insectes, avec une DL_{50} de 0,36 mL/cm² pour *S. zeamais* et de 0,48 mL/cm² pour *T. confusum* sur papier filtre. De plus, l'huile d'Eucalyptus s'est avérée plus toxique pour *S. zeamais* sur le maïs, avec une DL_{50} de 38,05 mL pour 40 g de grain. Ces deux huiles ont considérablement réduit la production de la descendance (F1) et la perte de poids des grains.

L'étude de Ndomo et al. (2009) a révélé que les huiles essentielles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) ont une forte action insecticide par contact contre *A. obtecus*. Dès le premier jour d'exposition, des doses élevées appliquées sur les graines (0,40 µL/g) et sur le papier filtre (0,251 µL/cm²) ont entraîné une mortalité de 72,6 % et 80 %, respectivement. Ces taux de mortalité ont augmenté pour atteindre 97,5 % et 100 %, respectivement, au quatrième jour d'exposition. Les valeurs de DL_{50} de l'HE des feuilles de *C. viminalis* contre les adultes d'*A. obtecus* ont été calculées à 0,103 µL/cm² sur papier filtre et 0,152 µL/g sur graines après deux jours d'exposition.

De même, [Hedjal-Chehheb et al. \(2013\)](#) ont rapporté qu'une dose de 50 µL d'HE de conifères, provenant d'Algérie et de Tunisie, affectait très significativement la longévité, la fécondité et l'émergence de *C. maculatus*. Il a été montré par [Kassemi \(2014\)](#), dans une étude faite sur la toxicité des HEs de *Pseudocystus integrifolius* et *Nepeta nepetella* à l'égard de cinq ravageurs des denrées stockées (*Callosobruchus maculatus*, *Acanthoscelides obtectus*, *Sitophilus granarius*, *Rhyzopertha dominica* et *Tribolium castaneum*) afin d'évaluer quelques paramètres biologiques tels que la mortalité, la fécondité et l'émergence des adultes. Les essences de *N. nepetella* exercent une toxicité plus ou moins importante vis-à-vis des cinq insectes étudiés. Ces HEs ont diminué la ponte des femelles et l'émergence des adultes de tous les ravageurs. De plus, un effet larvicide a été observé sur *T. castanum*, et un effet adulticide sur les quatre autres insectes. Ces effets étant liés à la dose d'HEs appliquée et à la durée d'exposition.

L'étude de [Taleb-Toudert \(2015\)](#) a examiné les propriétés insecticides de dix (10) plantes aromatiques sous forme de HEs à l'encontre de la bruche de niébé. Ces huiles ont montré leur efficacité dans le contrôle de certains stades de développement de *C. maculatus*. Le traitement par contact des bruches a montré que les HEs de *Eucalyptus globulus*, *E. radiata*, *Laurus nobilis* et *Salvia officinalis* se sont révélées particulièrement efficaces, réduisant significativement la durée de vie des bruches entre 1 et 21 heures (effet adulticide le plus important). De plus, les HEs de *L. nobilis* et *S. officinalis* ont totalement empêché la ponte, tandis que celles de *E. globulus* et *E. radiata*, à une concentration de 4 µL, ont inhibé l'éclosion des œufs de *C. maculatus*.

Des études récentes ont mis en évidence l'efficacité des huiles essentielles (HEs) de plusieurs plantes contre l'adulte de *C. maculatus*. Les HEs de *Juniperus oxycedrus* et *Pelargonium graveolens*, contenant principalement de l'α-pinène et du citronellol/geraniol respectivement, ont démontré une forte toxicité. Cependant, l'huile d'*Artemisia herba-alba*, riche en chrysanthénone et champhor, était moins active ([Kherroubi et al., 2021](#)).

Par ailleurs, les HEs de *Xylopi aethiopica*, riches en monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarburés, ont provoqué une forte mortalité chez le coléoptère-bruchidea (*C. maculatus*). Les résultats ont indiqué une dose létale 50 (LD₅₀) de $9,2 \pm 0,7$ g x kg⁻¹ et un temps léthal 50 (LT₅₀) de $69,6 \pm 0,4$ heures ([Thiam et al., 2021](#)).

Enfin, [Baghouzet al., \(2022\)](#) ont rapporté une forte activité biocide des HEs d'*Origanum compactum* et de *Rosmarinus officinalis*. Ces huiles, contenant principalement du carvacrol

(70,88%) et du 1,8-cinéole (62,35%) respectivement, ont montré une forte activité biocide par contact.

À ce stade de la discussion, certains auteurs ont montré que les terpènes étaient à l'origine de l'efficacité des huiles essentielles tandis que d'autres attribuent cette activité aux composés majoritaires. Dans notre étude, les huiles essentielles qui ont été les plus toxiques vis-à-vis des adultes de *C. maculatus* sont toutes majoritairement contenant l' α -pinène. On peut donc penser que ce composé monoterpénique soit responsable de l'activité biologique de ces huiles essentielles. À l'opposé de ce constat, l'analyse de la composition chimique des HEs étudiées révèle un taux appréciable en composés oxygénés. Il semble effectivement que les huiles essentielles les plus efficaces sont celles qui contiennent une proportion élevée de dérivés terpéniques oxygénés à fonction alcool, ce qui contraste avec nos extraits. Certains chercheurs avancent que l'efficacité rapide des huiles essentielles contre les insectes est due à leur effet neurotoxique. Elles inhiberaient certaines enzymes comme l'AChE, l'octopamine ou le cytochrome P450 des mono-oxygénases. Ces huiles seraient capables de pénétrer rapidement dans l'insecte et de perturber ses fonctions physiologiques (Lee et al., 2002; Coat et al., 1991; Abdelgaleil et al., 2009; Abd-Elhady, 2012). En outre, plusieurs autres facteurs peuvent influencer l'efficacité biocide des huiles essentielles, notamment la durée d'exposition, la dose, ainsi que les interactions de synergie et d'antagonisme entre les composants d'une huile. Par conséquent, une compréhension plus approfondie de ces facteurs est essentielle pour optimiser l'utilisation des huiles essentielles comme biopesticides.

V.2. Evaluation de l'effet des huiles essentielles par inhalation (fumigation) sur *C. maculatus*

Les résultats obtenus pour cet essai (Tableau 21 et Annexe II) montrent que toutes les huiles manifestent une activité insecticide par fumigation forte dès la première dose. Cette activité s'est stabilisée à des doses de 4 et 8 $\mu\text{L/mL}$ pour les aiguilles des deux espèces, mais a diminué pour les cônes de *P. nigra*. À la dose la plus élevée (16 $\mu\text{L/mL}$), la mortalité variait selon l'espèce (Figures 46 et 47). *A. numidica* a enregistré des taux de mortalité plus élevés, allant de 45 à 55 % pour différentes parties de la plante. En revanche, pour *P. nigra*, seuls les cônes ont atteint un taux de 42,5 % à la dose la plus élevée pendant les 4 jours d'exposition (Figure 46). Parmi les HEs testées, celles de branches et de cônes d'*A. numidica* ont montré la plus haute toxicité par inhalation au quatrième jour d'exposition à la dose la plus élevée (16 $\mu\text{L/mL}$), avec des taux de mortalité corrigés dépassant les 50%. Les autres huiles n'ont pas

atteint ce taux dans les mêmes conditions. Cette différence pourrait être due à la durée de rémanence et à la volatilité de ces huiles, qui présentent une fraction volatile significative.

La procédure Probit a été utilisée pour le calcul de la droite de régression par la méthode du maximum de vraisemblance. L'examen des doses et des temps létaux (**Tableaux 21**) à travers l'équation de la droite de régression ($y = ax + b$; la pente et l'interception) et les paramètres de l'adéquation du modèle probit (χ^2) et le seuil de signification P) nous ont permis de distinguer deux groupes d'HEs en fonction de leur toxicité :

♦ Le premier groupe comprend les huiles de différentes parties de *P. nigra*, avec des DL_{50} allant de 14.741 $\mu\text{L/mL}$ (aiguilles) à 28.767 $\mu\text{L/mL}$ (branches), et les aiguilles d'*A. numidica* avec une DL_{50} de 14.817 $\mu\text{L/mL}$.

♦ Le deuxième groupe, caractérisé par des DL_{50} et des TL_{50} plus faibles, comprend les branches ($DL_{50} = 9.983 \mu\text{L/mL}$, $TL_{50} = 132.313 \text{ h}$) et les cônes d'*A. numidica* ($DL_{50} = 7.47 \mu\text{L/mL}$, $TL_{50} = 128.949 \text{ h}$).

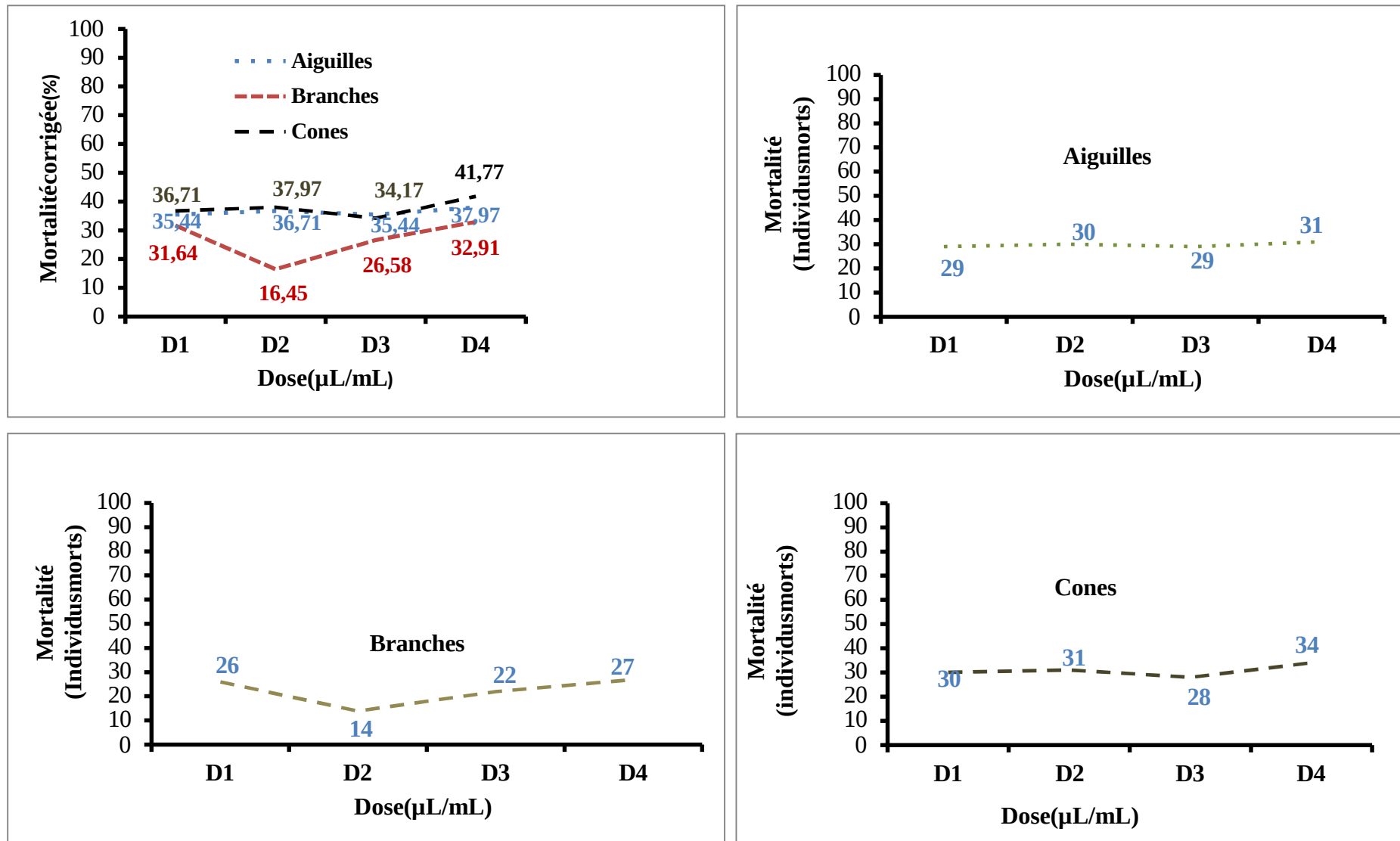


Figure 46: Variation de la mortalité et du pourcentage de mortalité corrigée par fumigation des différentes parties de *P. nigra*.

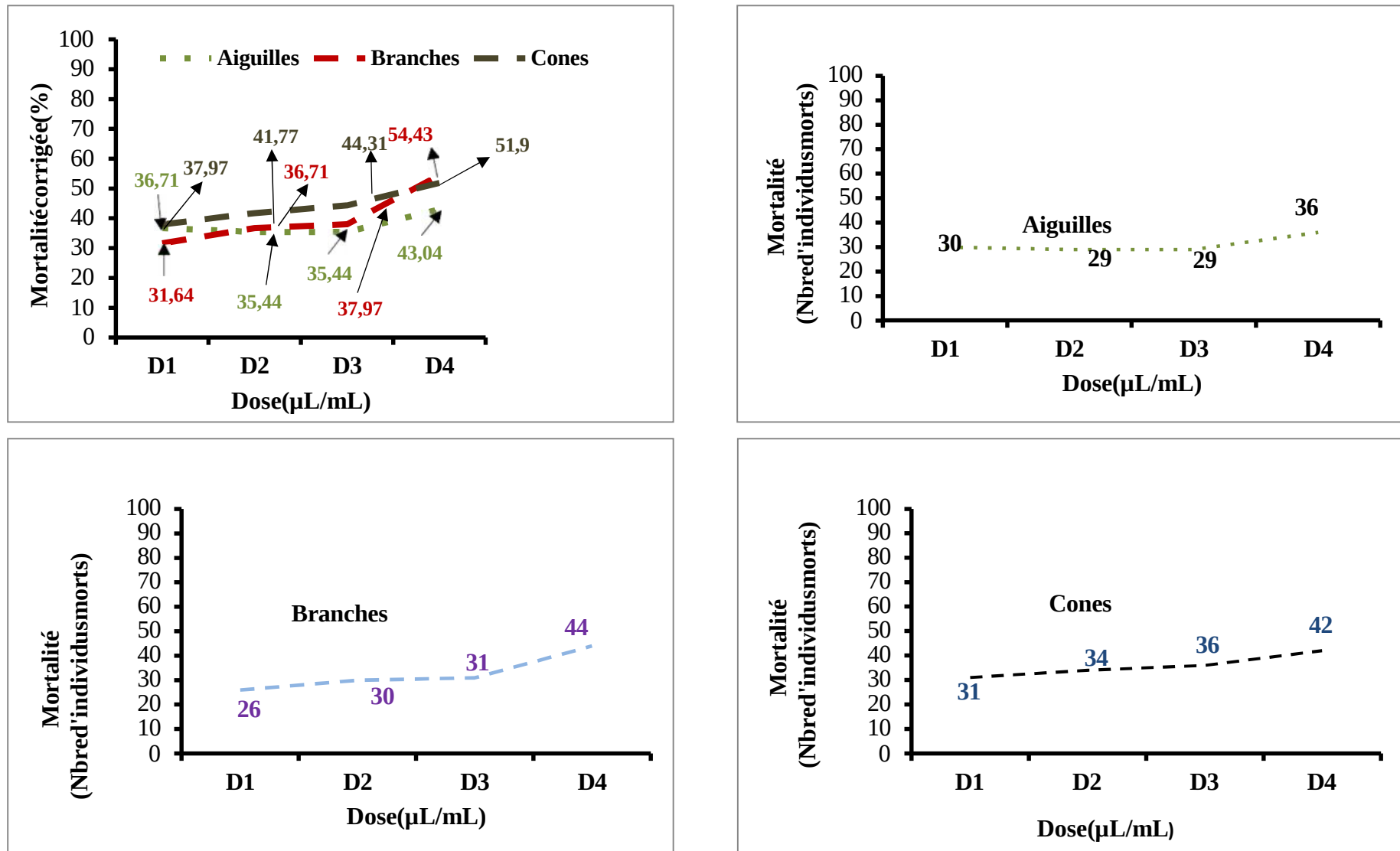


Figure47: Variation de la mortalité et du pourcentage de mortalité corrigée par fumigation des différentes parties d'*A. numidica*.

Activité insecticide des huiles essentielles

Tableau 21 : Toxicité comparée (inhalation) des HE extraites des différentes parties de *P. nigra* et de *A. numidica*.

Paramètres du modèle Probit							
Partie de la plante	DL ₅₀ (µL/mL) (min-max)	DL ₉₅ (µL/mL) (min-max)	χ^2	<i>p</i>	Interception	Pente ± Ecart type	TL50 (Heure) (min-max)
<i>P. nigra</i>							
Aiguilles	14.741 (9.272 – 46.498)	1546 (222.522 – 719068.938)	1.642	0.05	4.048	0.81 ± 0.217	154.101 (128.694 – 200.682)
Branches	28.767 (15.326 – 181.742)	2631.784 (313.505 – 26661801.5)	0.613	0.05	3.776	0.838 ± 0.227	287.509 (198.025 – 558.229)
Cônes	15.410 (9.022 – 81.602)	3632.907 (310.856 – 80871128)	0.531	0.05	4.175	0.693 ± 0.215	161.427 (132.536 – 216.884)
<i>A. numidica</i>							
Aiguilles	14.817 (8.793 – 71.022)	3280.771 (296.946 – 46412608)	1.849	0.05	4.178	0.701 ± 0.215	147.710 (124.049 – 190.443)
Branches	9.983 (7.09 – 17.964)	479.220 (122.705 – 14662.830)	0.320	0.05	4.022	0.978 ± 0.217	132.313 (114.650 – 161.563)
Cônes	7.470 (5.569 – 10.935)	227.593 (79.673 – 2330.172)	0.977	0.05	4.0318	1.108 ± 0.217	128.949 (111.924 – 156.977)

Outre l'effet adulticide observé, nous avons noté une agitation marquée des bruches au contact des vapeurs des huiles essentielles testées. En résumé, l'activité inhalatrice des différentes huiles essentielles dépend de l'espèce végétale utilisée. Cette variation semble être influencée par la durée d'exposition, la rémanence de l'huile essentielle et son indice de volatilité. **Paderini & Lucheroni (2003)** ont d'ailleurs souligné la faible volatilité des huiles essentielles de conifères.

Au terme de cet essai, il ressort que les HEs utilisées en fumigation sont susceptibles de contrôler les populations de *C. maculatus* dans un environnement de stockage expérimental. Plusieurs études ont démontré les propriétés insecticides des huiles essentielles par effet inhalatoire contre les ravageurs des denrées stockées. Cependant, la diversité et l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux rendent difficile l'identification précise des paramètres responsables de l'efficacité des huiles essentielles.

L'étude de **Hedjal-Chehheb et al. (2013)** a examiné la toxicité des huiles essentielles de certains résineux et plantes aromatiques de la famille des Myrtaceae, originaires d'Algérie et de Tunisie. Les résultats ont montré que, à faibles doses, *Tetraclinis articulata* et *Pinus halepensis* (deux conifères) n'ont pas montré de toxicité notable contre les bruches adultes, indépendamment de la durée d'exposition. Cependant, à des doses plus élevées, *T. articulata* a causé 75 % de mortalité. Concernant les Myrtaceae, seules les huiles essentielles d'*Eucalyptus cinerea* ont entraîné une mortalité de 100 % après 24 heures d'exposition à une dose de 25 µL/mL. Les auteurs suggèrent que la volatilité lente des essences de conifères pourrait expliquer la différence d'efficacité inhalatoire inhérente à ces deux familles de plantes.

Kassemi (2014) a également constaté que l'huile de *Nepalane petella* est plus efficace que celle de *Pseudocytisus integrifolius*. Cette efficacité se manifeste par une toxicité sur les adultes et une réduction significative, voire une inhibition totale, de la progéniture de la nouvelle génération. Les résultats ont révélé que la mortalité augmente avec la durée d'exposition et la concentration de l'huile. Cependant, l'efficacité des huiles essentielles par inhalation est relativement faible comparée à celle du traitement par contact. Nous avons observé la même tendance dans nos expériences avec les huiles de *P. nigra* et d'*A. numidica*. De plus, les travaux de **Taleb-Toudert (2015)** stipulent que les HEs d'*Eucalyptus globulus* et de *Salvia officinalis* sont toxiques par inhalation pour *C. maculatus*. Les mortalités enregistrées étaient de 71 et de 75 % après 24 heures de traitement à 8 µL/mL d'HE, respectivement. Les auteurs ont signalé aussi que les huit (8) HEs testées, hormis celle de *Pistacia lentiscus*, ont provoqué 100 % de

mortalité à 96 heures de traitement. Il convient cependant de souligner qu'au contraire de notre étude, la précédente étude renforce l'hypothèse de la lenteur de la volatilité des huiles de conifères étudiées dans le présent travail et par conséquent leur faible pouvoir inhalatoire enregistré.

Des études récentes, notamment celle de [Kirima et Omara \(2022\)](#), ont également souligné l'efficacité inhalatoire des huiles essentielles de aiguilles de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. Ils ont observé une mortalité de 100 % à 10 µL/ml chez les bruches du haricot après 2 heures d'exposition, et la même concentration a entraîné une mortalité de 100 % chez les charançons du maïs après 5 heures d'exposition. Ces résultats contrastent avec ceux de notre étude, étant donné que la composition chimique de *P. caribaea* est similaire (mais chémotype différent) à celle de *P. nigra*, caractérisée par une abondance de mono et sesquiterpènes hydrocarbonés (77.2 et 4.7%) et les composés majoritaires sont le limonène (38.6%), l' α -pinène (27.6%), le borneol (6.7%) et le myrcène (3.5%). La variabilité des constituants chimiques détermine la spécificité des huiles essentielles. L'activité biologique des huiles essentielles est également liée aux groupements chimiques fonctionnels présents dans l'huile et au chémotype de la plante concernée, comme l'ont souligné [Séri-Kouassi \(2004\)](#), [Ngamo et al. \(2007\)](#) et [Nyamador \(2009\)](#).

L'étude de [Thiam et al. \(2021\)](#) a mis en évidence les propriétés insecticides inhalatoires des huiles essentielles et de la poudre de *Xylopi aethiopica*. L'analyse chimique a révélé que les composés principaux étaient le β -pinène, le 1,8-cinéole et l' α -pinène. Leur efficacité biocide par inhalation, mesurée par la DL_{50} et le TL_{50} , était de 0.2 µL/cm⁻³ et de 16.4 ± 1.2 h. Ces résultats contrastent avec ceux de notre étude. Il est important de noter que, contrairement à notre étude, les expériences de ces auteurs ont été menées sur des grains de niébé, ce qui pourrait expliquer une pénétration plus profonde et une rémanence plus longue des terpénoïdes. Nous supposons que la volatilité ne peut pas être la seule explication de la perte d'activité biologique que nous avons observée dans des conditions sans substrat alimentaire. En raison de leur composition chimique, les huiles essentielles pourraient se dégrader naturellement à des vitesses variables au fil du temps. Cette dégradation pourrait être accentuée par certains facteurs environnementaux, tels que la température et la lumière, comme l'a souligné [Isman \(2000\)](#).

Bien que la toxicité des HE étudiées soit variable vis-à-vis des adultes de *C. maculatus*, il convient de souligner, contrairement à ce qui est rapporté dans certains travaux, que leur efficacité par fumigation dépend de divers facteurs, notamment leur degré de volatilité, leur

persistance, les interactions entre les composants (synergie et antagonisme), ainsi que la durée d'exposition.

V.3. Évaluation de l'effet répulsif des huiles essentielles sur les adultes de *C. maculatus*

L'exposition des adultes de *C. maculatus* à des doses croissantes d'HEs provoque une répulsion variable selon les plantes (**Tableau 22** et **annexe III**). Toutes les HEs utilisées ont un effet répulsif qui augmente avec la dose (dose-dépendant). L'évaluation du coefficient de répulsion des HEs sur les adultes de *C. maculatus* indique que toutes les essences testées sont modérément répulsives. Nous observons que la répulsion varie en fonction de la partie de la plante utilisée et des doses appliquées, la plus grande répulsion étant obtenue avec la dose la plus élevée (16 µL/mL). À l'exception des huiles d'aiguilles et de branches de *P. nigra*, toutes les autres huiles ont provoqué une répulsion de plus de 50 % à la dose de 4 µL/mL.

L'analyse de variance à deux facteurs pour *A. numidica* a montré une différence significative en fonction de la dose ($F = 6.15$; $P = 0.002$; DDL = 3), mais pas en fonction de l'organe ($F = 1.71$; $P = 0.195$; DDL = 2) ni de l'interaction entre l'organe et la dose ($F = 0.51$; $P = 0.796$; DDL = 6). De la même manière, pour *P. nigra*, l'analyse a révélé une différence significative en fonction de la dose ($F = 2.60$; $P = 0.067$; DDL = 3), mais pas en fonction de l'organe ($F = 0.78$; $P = 0.466$; DDL = 2) ni de l'interaction entre l'organe et la dose ($F = 0.30$; $P = 0.932$; DDL = 6).

En ce qui concerne la répulsion moyenne, les différentes huiles d'*A. numidica* et les cônes de *P. nigra* ont montré des taux de répulsion moyens allant de 51,25 % à 60 % (**Tableau 22**). L'huile la plus répulsive est celle des cônes (60 %) et des branches d'*A. numidica* (58 %) suivie de celle des cônes de *P. nigra* (56 %).

Tableau 22: Pourcentage de répulsion en fonction de la dose et de la répulsivité moyenne des HEs de *P. nigra* et d'*A. numidica*.

Doses (µL/ml) et Pourcentage de Répulsion / Classe de répulsion						
Partie de la plante	2	4	8	16	PR_{moyen}	Classe de répulsion (Echelle de Mc Donald)
<i>P. nigra</i>						
Aiguilles	15 ^c ± 2.51 (classe II)	42.5 ^{abc} ± 1.7 (classe III)	45 ^{abc} ± 1.73 (classe III)	67.5 ^{ab} ± 0.95 (classe IV)	42 ± 1.72	Classe III (Modérément répulsive)
Branches	27.5 ^c ± 1.5 (classe II)	40 ^{abc} ± 0.81 (classe III)	60 ^{ab} ± 0.5 (classe IV)	70 ^a ± 0.81 (classe IV)	49.37 ± 0.095	Classe III (Modérément répulsive)
Cônes	40 ^{abc} ± 1.15 (classe III)	55 ^{ab} ± 0.95 (classe III)	65 ^{ab} ± 1.25 (classe IV)	65 ^{ab} ± 0.95 (classe IV)	56.25 ± 0.15	Classe III (Modérément répulsive)
<i>A. Numidica</i>						
Aiguilles	45 ^{ab} ± 2.63 (classe III)	50 ^{ab} ± 1.73 (classe III)	55 ^{ab} ± 1.3 (classe III)	55 ^{ab} ± 2.06 (classe III)	51.25 ± 1.78	Classe III (Modérément répulsive)
Branches	40 ^b ± 0.81 (classe III)	55 ^{ab} ± 0.95 (classe III)	65 ^{ab} ± 0.95 (classe IV)	75 ^{ab} ± 0.5 (classe IV)	58.75 ± 0.99	Classe III (Modérément répulsive)
Cônes	40 ^{ab} ± 0.5	55 ^{ab} ± 0.95	65 ^{ab} ± 0.95	80 ^a ± 0.5	60 ± 1.02	Classe III (Modérément répulsive)

***L'analyse de la variance à 2 facteurs (partie de la plante et dose) suivie de comparaison de moyennes par le test de Fisher ($P \leq 0.05$) a été effectuée séparément pour chacune des 2 espèces.

****Les moyennes ne partageant aucune lettre sont significativement différentes.

À l'issue de ce test, les effets répulsifs des HEs contre les ravageurs des denrées stockées dépendent de plusieurs facteurs, entre autres l'insecte modèle (le niveau de sensibilité, l'âge... etc), la composition chimique des HEs (les composés majoritaires, les interactions entre composants, l'altération ou la dégradation de l'huile, le degré de volatilité), et d'autres liés aux conditions opératoires (la durée d'exposition, la dose de l'huile, la température et la photopériode). En effet, de nombreux travaux publiés dans la littérature ont mis en évidence l'effet répulsif des HEs et autres extraits végétaux *vis-à-vis* des insectes des denrées stockées.

Tapondjou et al., (2003) ont démontré que les HEs d'*Eucalyptus saligna* et de *Chenopodium ambrosioides* sont répulsives à l'égard de *C. maculatus*. L'efficacité de ces huiles augmente avec la dose. Selon le classement de **McDonald et al. (1970)**, l'huile d'*E. saligna* appartient ainsi à la classe de répulsion IV (89%) alors que celle de *C. ambrosioides* appartient à la classe V (71%). Cette forte répulsion serait liée à la composition chimique des deux huiles où les composés les plus importants pour *E. saligna* sont l' α -pinène (39,4 %), le p-cymène (31,1%), le 1,8-cinéole (9,8%) et le γ -terpinène (9,5%) tandis que, les principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *C. ambrosioides* sont le p-cymène (50,0%), le α -terpinène (37,6%) et l'ascaridole (3,5%).

Boukraa et al., (2020) ont également souligné l'effet répulsif des huiles d'*Artemisia herba-alba*, *Rosmarinus officinalis* et *Juniperus phoenicea* sur *Tribolium castaneum*. Ils ont constaté que la répulsion augmentait avec la concentration en huile. Les huiles d'*A. herba-alba* et de *J. phoenicea* étaient les plus répulsives à la plus forte concentration utilisée (2 μ L) pendant 30 minutes, avec des taux de répulsion de 100 % et 90 % respectivement. Cependant, leur combinaison n'a entraîné que 76 % de répulsion dans les mêmes conditions. Les huiles de *R. officinalis* étaient les moins efficaces, avec seulement 41% de répulsion. Ces résultats tendent à confirmer l'hypothèse que l'efficacité des huiles essentielles dépend de la nature de leurs principaux composants.

Gupta et al. (2023) ont récemment démontré l'effet répulsif des HEs de plusieurs plantes, dont *Acorus calamus*, *Hedychium spicatum*, *Lavandula angustifolia*, *Juniperus recurva*, *Juniperus communis*, *Cedrus deodara* et *Pinus wallichiana* à l'égard de deux coléoptères Bruchineae. Les résultats indiquent que *A. calamus* est la plus répulsive contre *C. maculatus* et *C. chinensis* (CR_{50} = 53,98 et 118,91 μ L/L, respectivement) après 24 h, suivie de *H. spicatum* (CR_{50} = 293,77 et 226. 85 μ L/L, respectivement) et de *J. recurva* (CR_{50} = 309.75 et 383.51 μ L/L, respectivement) comparativement aux autres HEs chez *C. maculatus* (CR_{50} = 955.15-

736.82 $\mu\text{L/L}$) et *C. chinensis* (617.11 - 47.27 $\mu\text{L/L}$). Ces résultats peuvent être attribués à la concentration d'huile utilisée, au temps de traitement, à la composition chimique des HEs et à la sensibilité de l'insecte.

Par ailleurs, [Chauhan et al. \(2022\)](#) ont constaté que les HEs d'*Artemisia maritima* repoussent 92-96% des adultes de *C. maculatus* et *C. chinensis* après une heure. Cette répulsion est attribuée à la présence de 1,8 cinéol (41.14 %) et de l'acétate de bornyl (18.10 %) dans ces huiles, qui sont connus pour leur effet insecticide ([Papachristos et al., 2004](#)). La durée d'exposition et la sensibilité des coléoptères aux HEs semblent également contribuer à cette forte répulsion. En somme, l'efficacité insectifuge reconnue de certaines plantes aromatiques, suffisamment relayée dans la littérature, corrobore les résultats de la présente étude. Elle explique également les variations observées dans l'efficacité insecticide des huiles essentielles des deux *Pinaceae* utilisées pour contrôler expérimentalement les dégâts occasionnés par les adultes de *C. maculatus*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abd-Elhady, H. (2012). Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Plant Protection Research*, 52 (03), 347-352.
2. Abdelgaleil S. A., Mohamed M. I., Badawy M. E. and El-arami S. A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 518-525.
3. Baghouz A., Bouchelta Y., Es-safi I., Bourhia M., Abdelfattah El M., Alarfaj A.A., A.H Hirad, Nafidi H-A. and Guemmouh R. (2022). Identification of volatile compounds and insecticidal activity of essential oils from *Origanum compactum* Benth. and *Rosmarinus officinalis* L. against *Callosobruchus maculatus* (Fab.). *Journal of Chemistry*, 2022.
4. Boukraa N., Ladjel S., Goudjil M.B., Eddoud A. and Sanori K.W.M. (2020). Chemical compositions, fumigant and repellent activities, of essential oils from three indigenous medicinal plants and their mixture, against stored grain pest, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Asian Journal of Research in Chemistry*, 13 (6), 455-464.
5. Chauhan N., Kashyap U., Dolma S.K. and Reddy S.G.E. (2022). Chemical composition, insecticidal, persistence and detoxification enzyme inhibition activities of essential oil of *Artemisia maritima* against the pulse beetle. *Molecules*, 27 (5), 1547.
6. Coats J.R., Karr L.L. and Drewes C.D. (1991). Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. PA Hedin Naturally occurring pest bioregulators 1991. 305-316. In *American Chemical Society. symposium series* (Vol. 449).
7. Gupta H., Urvashi D. and Reddy S.E. (2023). Insecticidal and detoxification enzyme inhibition activities of essential oils for the control of pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). *Molecules*, 28 (2), 492.
8. Hedjal-Chehheb M., Toudert-Taleb K., Khoudja M.L., Benabdesselam R., Mellouk M. and Kellouche A. (2013). Essential oils compositions of six conifers and their biological activity against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Bruchidae) and *Vigna unguiculata* seeds. *African Entomology*, 21 (2), 243-254.
9. Isman, M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19 (8-10), 603-608.

10. Kassemi N. (2014). Activités biologiques des poudres et des huiles essentielles de deux plantes aromatiques (*Pseudocytisus integrifolius* Salib. et *Nepeta nepetella* L.) sur les ravageurs du blé et des légumes secs. Thèse en vue de l'obtention de Doctorat en Biologie. Option: Ecologie Animale. Université de Tlemcen. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers. Département d'Ecologie et Environnement. 164 p.
11. Kherroubi M., Zerrouk I.Z., Rahmoune B., Zaidat S.A.E., Messadi O. and Mouhouche F. (2021). Evaluation of the potential insecticide activity of three plants essential oil against the chickpea seeds beetles, *Callosobruchus maculatus*. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 28 (1), 97-102.
12. Kirima J.M. & Omara T. (2022). Chemical composition and insecticidal activity of *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* needles against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Callosobruchus maculatus* Fabricius. In *Advances in Phytochemistry, Textile and Renewable Energy Research for Industrial Growth* (pp. 162-169). CRC Press.
13. Lee B.H., Lee S.E., Annis P.C., Pratt S.J., Park B.S. and Tumaalii F. (2002). Fumigant toxicity of essential oils and monoterpenes against the red flour beetle: *Tribolium castaneum* herbst. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5 (2), 237-240.
14. McDonald LL, Guy RH and Speirs RD. (1970). Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insects. Marketing Research Report No. 882. Washington (DC): Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture.
15. Ndomo A.F., Tapondjou A.L., Tendonkeng F. and Tchouanguep F.M. (2009). Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). *Tropicultura*, 27 (3), 137-143.
16. Ngamo T.S.L., Ngatanko I., Ngassoum M.B., Mapongmestsem P.M. and Hance T. (2007). Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. *African Journal of Agricultural research*, 2 (4), 173-177.
17. Nyamador S.W. (2009). Influence des traitements à base d'huiles essentielles sur les capacités de reproduction de *Callosobruchus subinnotatus* Pic. et de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) : mécanisme d'action de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. Thèse de Doctorat, Univ. Lomé, Togo, 174 p.
18. Padriani, F. & Lucheroni M. T. (2003). Le grand livre des huiles essentielles. *Éditions de Vecchi*. 205 p.
19. Papachristos D.P., Karamanoli K.I., Stamopoulos D.C. and Menkissoglu-Spiroudi U. (2004). The relationship between the chemical composition of three essential oils and their

insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 60 (5), 514-520.

20. Seri-Kouassi B. P. (2004). Entomofaune du niébé (*Vigna unguiculata* L. (WALP)) et impact des huiles essentielles extraites de neuf plantes locales sur la reproduction de *Callosobruchus maculatus* FAB. (Coleoptera: Bruchidae) en Côte d'Ivoire. *Thèse de Doctorat d'état ès-Sciences*. Université de Cocody (Côte d'Ivoire). 199 p.

21. Taleb-Toudert K. (2015). Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien): évaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Département de Biologie Animale et Végétale, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou*. 160 p.

22. Tapondjou L.A., Adler C.F.D.A., Bouda H. and Fontem D.A. (2003). Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* et *Eucalyptus saligna* à l'égard de la bruche du niébé, *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera, Bruchidae). *Cahiers Agricultures*, 12 (6), 401-407.

23. Tapondjou A.L., Adler C.F.D.A., Fontem D.A., Bouda H. and Reichmuth C. H. (2005). Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research*, 41 (1), 91-102.

24. Thiam A., Guèye M.T., Sangharé C.H., Cissokho P.S., Ndiaye El.B., Diop S.M., Diop M.B., Ndiaye I. and Fauconnier M.L. (2021). Characterization by GC/MS-FID and GC/MS-MS-SPME and insecticidal activity against *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) of essential oils and powder of *Xylopias aethiopica* (Dunal) A. Rich from Senegal. *Journal of Plant Protection Research*, 61 (3), 203-212.

Activitésherbicide

VI. Évaluation de l'effet herbicide des huiles essentielles de *P. nigra* et de *A. numidica*

numidica

Les effets phytotoxiques des HEs des deux Pinaceae étudiées ont été évalués sur le stade graine (pré-germination) et le stade post-germination (plantule) pour deux types de graines d'adventices de culture et deux semences. L'efficacité herbicide des HEs a été déterminée par la mesure du taux de germination et de certains indicateurs physiologiques et biochimiques associés au stress oxydatif induit par les essences utilisées.

VI.1. Stade pré-germination (graine)

Notre étude sur l'interaction allélochimique entre HEs et les adventices/semences (**Tableau 23**) a révélé que les substances sémiocchimiques issues des différentes parties de *P. nigra* et de *A. numidica* inhibent la germination et la croissance des parties aériennes des graines germées. Cette inhibition est modulée par la concentration d'huile essentielle utilisée et la sensibilité de la plante cible. Plus précisément, l'effet inhibiteur de *A. numidica* est plus prononcé (intense) que celui de *P. nigra*, en particulier sur les deux adventices testées. Les huiles extraites des branches des deux espèces, contrairement à celles des cônes et des aiguilles, ont montré une forte capacité à inhiber la germination des adventices. Cette activité inhibitrice est proportionnelle à la dose, avec une intensité accrue à des doses plus élevées.

En outre, nous avons observé une sensibilité marquée de *S. arvensis* à l'action des HEs étudiées, tandis que *P. canariensis* a montré une réaction plus prononcée aux doses plus élevées des HEs.

En ce qui concerne le blé dur et le radis cultivé, ils ont été moins affectés par les traitements appliqués. Il est important de noter que ces résultats suggèrent une relation dose-réponse dans l'effet inhibiteur des HEs sur la germination et la croissance des adventices. Cela signifie que l'intensité de l'inhibition augmente avec l'augmentation de la dose d'HE appliquée.

L'analyse de variance à deux facteurs pour *A. numidica* a montré une différence hautement significative en fonction de la dose ($F=6.15$; $P=0.002$; DDL=3), en fonction de l'adventice / semence ($F = 1.71$; $P = 0.195$; DDL = 2) et de l'interaction entre l'adventice / semence et la dose ($F = 0.51$; $P = 0.796$; DDL = 6). De la même manière, pour *P. nigra*, l'analyse a révélé une différence hautement significative en fonction de la dose ($F=2.60$; $P=0.067$; DDL=3), en fonction de l'adventice / semence ($F = 0.78$; $P = 0.466$; DDL = 2) et de l'interaction entre l'adventice / semence et la dose ($F = 0.30$; $P = 0.932$; DDL = 6).

En conclusion, notre étude a démontré que les sémiochimiques dérivées de *P. nigra* et d'*A. numidica* ont un potentiel inhibiteur sur la germination et la croissance des adventices. Cependant, l'effet est modulé par la concentration d'huile essentielle utilisée et la sensibilité de la plante cible. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles recherches pour explorer l'utilisation potentielle de ces HEs comme bioherbicides naturels dans la gestion des adventices. Cependant, il est important de noter que bien que ces résultats soient prometteurs, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de ces HEs dans des conditions de terrain réelles. De plus, des études toxicologiques et environnementales sont nécessaires pour évaluer l'impact potentiel de l'utilisation de ces HEs sur l'environnement et la santé humaine.

En somme, cette étude a fourni des preuves préliminaires de l'efficacité potentielle des HEs dérivées de *P. nigra* et d'*A. numidica* comme agents de lutte biologique contre les adventices. Ces résultats pourraient avoir des implications significatives pour le développement de stratégies de gestion des adventices plus durables et respectueuses de l'environnement.

Activité herbicide des huiles essentielles

Tableau 23 : Effet des HES de *P. nigra* et de *A. numidica* sur la capacité germinative (%) des différentes adventices et semences étudiées.

Graine	Dose (µL/mL)	Germination(%)					
		Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
<i>Sinapis arvensis</i>	0	98,01 ± 2,21	97,33 ± 1,15	98,67 ± 1,15	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	1	80,20 ^{ABC} ± 19,05	79,90 ^C ± 0,46	80,00 ^D ± 1,00	83,67 ^B ± 1,53	80,33 ^D ± 0,58	81,33 ^B ± 1,15
	2	61,63 ^{CD} ± 6,34	60,67 ^D ± 0,58	60,90 ^E ± 0,46	62,67 ^D ± 1,15	60,67 ^F ± 2,31	61 ^D ± 2,65
	3	34,80 ^E ± 4,08	30,20 ^G ± 1,64	30,27 ^H ± 0,64	38,67 ^G ± 1,15	33,47 ^H ± 1,36	34,60 ^G ± 0,53
<i>Phalaris canariensis</i>	0	98,67 ± 1,53	99,33 ± 1,15	98,33 ± 1,15	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	1	85,87 ^{AB} ± 5,91	78,00 ^C ± 2,00	85,00 ^{CD} ± 1,73	87,50 ^B ± 0,87	80,00 ^D ± 2,00	86,33 ^B ± 1,53
	2	55,60 ^D ± 4,20	47,35 ^E ± 1,53	52,27 ^F ± 1,62	57,33 ^E ± 1,15	48,67 ^G ± 1,15	53 ^E ± 2,65
	3	42,43 ^{DE} ± 6,81	40,05 ^F ± 2,44	41,23 ^G ± 1,25	45,00 ^F ± 1,50	43,33 ^G ± 1,53	44,67 ^E ± 0,76
<i>Triticum durum</i>	0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	1	100 ^A ± 0	98,67 ^A ± 1,15	97,33 ^A ± 1,15	98,33 ^A ± 1,53	97,33 ^A ± 1,15	97,67 ^A ± 0,58

Activité herbicide des huiles essentielles

	2	98,00 ^A ±2,00	95,33 ^A ± 1,15	95,67 ^{AB} ±0,58	97,33 ^A ± 0,58	94,67 ^{AB} ±2,52	96,00 ^A ±1,00
	3	96,67 ^{AB} ±1,15	90,00 ^B ± 2,00	91,33 ^{BC} ±1,15	94,33 ^A ±1,15	90,33 ^{BC} ±2,52	92,33 ^A ±2,52
<i>Rhaphanussativus</i>	0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
	1	99,33 ^A ±1,15	98,67 ^A ± 2,31	98,67 ^A ±1,15	95,67 ^A ± 0,58	95,67 ^{AB} ±0,58	95,67 ^A ±0,58
	2	88,67 ^{AB} ±1,15	80,67 ^B ± 1,15	86 ^D ±2	88,00 ^B ± 4,00	85,33 ^{CD} ±1,53	86,33 ^B ±1,53
	3	77,00 ^{BC} ±1,73	61,33 ^D ± 1,15	67,67 ^E ±2,52	75,67 ^C ±2,08	69,00 ^E ±2,65	71,33 ^C ±3,06

***Les valeurs sont des moyennes ± écarts-types (n=3); Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Au cours de nos investigations expérimentales, nous avons observé que l'application des HEs à la dose minimale entraînait une inhibition partielle de la germination. Cette inhibition s'accompagnait d'un retard dans le processus de levée de germination ainsi que d'une entrave à l'élongation de l'hypocotyle et de la radicule, deux composantes essentielles du développement initial de la plante. De plus, une diminution notable de la vitesse de germination a été enregistrée, en particulier pour les deux adventices étudiés.

Par ailleurs, nous avons constaté que *S. arvensis* et *P. canariensis* germaient plus lentement que *T. durum* et *R. sativus*. En outre, il a été constaté que *S. arvensis* et *P. canariensis* présentaient une germination plus lente et une sensibilité élevée aux traitements par les différentes HEs comparativement à *T. durum* et *R. sativus*.

La littérature scientifique est riche en analyses détaillées et approfondies qui mettent en exergue le phénomène allélopathique manifesté par certaines espèces végétales, illustrant ainsi leur potentiel phytotoxique à l'égard des plantes adventices. Dans cette optique, [Amri et al. \(2011\)](#) ont examiné l'efficacité phytotoxique des HEs extraites des aiguilles de *Pinus patula* sur quatre adventices (*S. arvensis*, *L. rigidum*, *P. canariensis* et *Trifolium campestre*) en zones cultivées en Tunisie. L'huile essentielle a fortement inhibé la germination et la croissance des semences en fonction de la dose et l'effet était significativement plus efficace sur les dicotylédones (*S. arvensis* et *T. campestre*) que sur les monocotylédones (*L. rigidum* et *P. canariensis*). En effet, à des concentrations plus faibles (de 1 à 3 $\mu\text{L/mL}$ pour les dicots et de 1 à 4 $\mu\text{L/mL}$ pour les monocots), la germination et la croissance des plantules des adventices ont été partiellement réduites. Cependant, à des concentrations élevées (4 $\mu\text{L/mL}$ pour les dicots et 5 $\mu\text{L/mL}$ pour les monocots), la germination et la croissance des plantules de toutes les adventices testées ont été totalement inhibées.

Dans une étude ultérieure portant sur les propriétés allélochimiques des HEs des aiguilles de *Pinus halepensis*, menée par [Amri et ses collègues](#) en 2013, une activité herbicide significative (statistiquement) a été observée. Ces HEs ont été testées sur trois mauvaises herbes couramment rencontrées dans les cultures céréalières en Tunisie, à savoir *S. arvensis*, *Lolium rigidum* et *R. raphanistrum*. À une concentration de 2 $\mu\text{L/mL}$, ces HEs ont inhibé la germination des graines de ces adventices.

Dans une étude antérieure, [Amri et ses collaborateurs \(2012\)](#) ont exploré les propriétés herbicides de l'huile des aiguilles de *P. pinea* (arbres âgés de 50 ans) sur les mêmes adventices. Ils ont constaté que cette huile inhibait totalement la germination des graines à des

concentrations élevées. Cependant, à des doses plus faibles, l'huile exerçait un effet différent : elle retardait et réduisait la germination, tout en inhibant la croissance des pousses de toutes les adventices testées. Cela contraste avec l'effet de l'herbicide commercial 2,4 D (ou acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) utilisé, qui a un mode d'action différent. [Hanana et al. \(2014\)](#) ont également souligné les potentielles propriétés herbicides des huiles essentielles des aiguilles de trois espèces de pin (arbres âgés de 20 ans) : *P. brutia*, *P. coulteri* et *P. caribaea*. L'évaluation de l'activité herbicide de ces huiles vis-à-vis des espèces testées (*S. arvensis*, *P. canariensis* et *T. turgidum*) a révélé un effet inhibiteur significatif (en termes d'analyse statistique) sur leur germination et leur croissance. L'analyse de l'activité biologique de ces huiles a montré une forte action phytotoxique contre les adventices testées, bien que de moindre impact sur le blé dur cultivé. Il convient de noter que les espèces testées ont manifesté des niveaux de sensibilité variables. *S. arvensis* étant la plus sensible aux différentes HEs, tandis que l'HE de *P. coulteri* s'est avérée la plus efficace.

Aussi, dans des travaux récents, [Amri et ses collaborateurs](#) ont investigué les propriétés herbicides des HEs issues de diverses espèces du genre *Pinus*. Ils ont examiné l'efficacité de l'HE des aiguilles de *P. nigra* subsp. *laricio* en tant que bioherbicide contre *S. arvensis*, *T. campestre* et *P. canariensis*. Les résultats ont révélé une inhibition dose-dépendante de la germination et de la croissance des semis, avec un effet particulièrement prononcé sur *S. arvensis* que sur *T. campestre* et *P. canariensis*. À des concentrations plus faibles (1 à 3 µL/mL pour *S. arvensis* et 1 à 4 µL/mL pour *T. campestre* et *P. canariensis*), une réduction partielle de la germination et de la croissance des semis a été observée. Cependant, à des concentrations plus élevées (4 µL/mL pour *S. arvensis* et 5 µL/mL pour *T. campestre* et *P. canariensis*), la germination et la croissance des semis ont été totalement inhibées ([Amri et al., 2017](#)). Par ailleurs, l'huile essentielle des aiguilles de *P. radiata* a également été évaluée pour son action contre les mêmes adventices. Cette HE a manifesté une inhibition de la germination et de la croissance des semis statistiquement significative, de manière dose-dépendante, avec une efficacité accrue contre les dicotylédones (*S. arvensis* et *T. campestre*) par rapport aux monocotylédones (*P. canariensis*). À des concentrations plus faibles (de 1 à 3 µL/mL pour les dicots et de 1 à 4 µL/mL pour *P. canariensis*), une inhibition partielle a été constatée. Néanmoins, des concentrations élevées (4 µL/mL pour les dicots et 6 µL/mL pour *P. canariensis*) ont entraîné une inhibition totale de la germination et de la croissance des plantules de toutes les adventices testées ([Amri et al., 2021](#)). Ainsi, les HEs des cônes de *P. brutia*, *P. nigra* subsp. *laricio* et *P. pinea* ont été évaluées pour leur capacité antigerminative contre *P. canariensis*, *S. arvensis* et *T. durum* ([Amri et al., 2022](#)). Les résultats montrent des effets

inhibiteurs significatifs (suite à une analyse de variance) sur la germination des graines des différentes espèces de plantes testées. La réduction de la germination dépend du type d'HE, de la concentration utilisée et de la réponse de l'espèce testée. À une concentration de 3 $\mu\text{L/mL}$, les trois huiles utilisées ont provoqué une inhibition complète de la germination des graines des adventices testées. Cependant, le taux d'inhibition de la germination des graines le plus élevé a été observé avec l'HE de *P. pinea*, avec une inhibition complète de la germination des graines de *S. arvensis* à 2 $\mu\text{L/mL}$. Pour la germination des graines de *P. canariensis*, les trois huiles essentielles testées ont provoqué une réduction à une concentration de 2 $\mu\text{L/mL}$. Cependant, les huiles essentielles de *P. brutia* et de *P. nigra* ont eu les effets d'inhibition les plus élevés de la germination des graines sans germination des graines de *P. canariensis* à des concentrations de 3 $\mu\text{L/mL}$, sauf pour *P. pinea* où le pourcentage de germination était de 3,33%. *Triticum durum*, qui est une espèce monocotylédone cultivée, est la plus résistante à toutes les huiles testées. En fait, à des concentrations élevées (3 $\mu\text{L mL}^{-1}$), la germination de *T. durum* n'a été réduite que de 40 à 50 % pour toutes les HEs utilisées. Alors qu'à la même concentration, une inhibition complète de la germination a été notée pour les deux autres adventices. De plus, [Khedhri et al. \(2022\)](#) ont étudié la variation des effets phytotoxiques des HEs des aiguilles, des branches et des cônes de *P. pinaster* sur les mêmes adventices et semence que précédemment. Les résultats enregistrés ont montré que la germination et la croissance des semis ont été fortement inhibées par le traitement à l'HE en fonction de la dose, et toutes les adventices testées ont montré différents degrés de sensibilité. À la dose de 2 $\mu\text{L/mL}$, l'HE des cônes et des aiguilles a complètement inhibé la germination et la croissance des semis de *S. arvensis*. Alors que *P. canariensis* semble être légèrement résistant à la même dose aux trois huiles essentielles testées. Cependant, un faible effet phytotoxique a été obtenu avec l'huile de branches par rapport aux huiles d'aiguilles et de cônes. En ce qui concerne *S. arvensis*, l'huile extraite des cônes est la plus puissante, supprimant l'allongement des pousses de 40 % et 64 % à 1 et 2 $\mu\text{L/mL}$ respectivement. À 3 $\mu\text{L/mL}$, l'effet inhibiteur a été renforcé de manière significative (suite à une ANOVA), atteignant 100 % par rapport au contrôle. De même, pour l'élongation des racines, l'effet suppressif a été renforcé à 42 % par 1 $\mu\text{L/mL}$ d'huile, et à 70 % à la dose de 2 $\mu\text{L/mL}$. Cependant, l'huile de cônes a presque complètement anéanti les plantules (100 %). D'autre part, l'effet phytotoxique était plus important sur les adventices que sur le blé dur cultivé, sa germination est légèrement affectée à la dose de 3 $\mu\text{L/mL}$, enregistrant une inhibition, qui est loin d'être totale, environ 50 % après l'application de l'HE de cônes et 70 % pour les aiguilles.

D'autres familles de plantes aromatiques, reconnues pour leur potentiel allélopathique contre les adventices en agriculture, sont abondamment étudiées dans la littérature scientifique. La famille des Myrtaceae, en particulier le genre *Eucalyptus*, est notamment bien documentée à cet égard. En effet, l'efficacité phytotoxique des HEs extraites des feuilles d'*Eucalyptus citriodora* a été expérimentalement évaluée pour réduire la germination de quatre espèces adventices, à savoir *Sinapis arvensis*, *Sonchus oleraceus*, *Xanthium strumarium* et *Avena fatua* (Benchaa et al., 2018). Contrairement à tout ce qui a été déjà rapporté, les résultats ont révélé un effet allélopathique inversement proportionnel à la dose d'HE appliquée. À une concentration de 0,01 %, une réduction significative de la germination a été observée pour toutes les espèces, à l'exception de *X. strumarium*. À 0,02 %, la germination des graines de *S. arvensis*, *S. oleraceus*, *A. fatua* et *X. strumarium* a été considérablement inhibée, avec des réductions de 93,6%, 90,91%, 81,17% et 61,66% par rapport au contrôle, respectivement. La concentration la plus élevée, 0,03 %, a totalement inhibé la germination des graines de *S. arvensis* et a manifesté un effet d'inhibition important sur les autres graines. De même, les graines germées dans les boîtes de Petri traitées ont présenté une réduction significative (suite à une ANOVA) de la longueur des racines et des pousses aux concentrations de 0,02% et 0,03% par rapport au contrôle.

Des études plus récentes ont mis en exergue les propriétés herbicides d'autres espèces végétales du genre *Eucalyptus*. Khammassi et al. (2023) ont exploré le potentiel allélochimique des HEs d'*E. maculata* à l'égard de deux graines adventices (*P. canariensis* et *S. arvensis*) et de la culture du blé dur (*T. durum*). Les résultats indiquent que les HEs d'*Eucalyptus maculata* ont affecté la germination de toutes les plantes testées de manière dose-dépendante. En effet, à 0,5 µL/mL, une réduction significative de la germination de *S. arvensis* a été observée. Cependant, cette dose n'a eu aucun effet sur le blé et *P. canariensis*. À 3 µL/mL, les HEs ont partiellement inhibé la germination de toutes les espèces testées. Outre l'inhibition de la germination, l'effet phytotoxique des huiles s'est également traduit par une réduction proportionnelle de la croissance des parties aériennes pour toutes les plantes, en fonction de la concentration utilisée. Des effets similaires ont été observés pour la croissance des parties racinaires, avec une inhibition significative de la croissance des pousses racinaires de *S. arvensis* à la dose de 0,5 µL/mL.

Par ailleurs, les HEs extraites des feuilles de trois espèces introduites en Tunisie, du genre *Eucalyptus* (*E. oleosa*, *E. pimpiniana*, *E. polyanthemos*) ont été utilisées, dans des conditions de laboratoire comme bioherbicide, d'une part, pour contrôler la prolifération de *S. arvensis* et

d'autre part, sur deux graines cultivées (semences de *Lepidium sativum* et *Raphanus sativus*) pour approuver l'usage de ces huiles comme agent de lutte en agriculture durable (Kouki et al., 2023). Les résultats ont indiqué une inhibition significative (suite à une analyse statistique) de la germination des graines des plantes testées de manière dose-dépendante et selon le type d'huile essentielle testée. En résumé, les huiles essentielles de deux espèces (*E. pimpiniana* et *E. oleosa*) ont complètement inhibé la germination de *S. arvensis* et de *R. sativus* à 1 µL/mL. À l'inverse, les huiles essentielles d'*E. polyanthemos* ont inhibé la germination des graines des mêmes espèces de 75 et 55 %, respectivement. Cependant, l'huile essentielle d'*E. oleosa* a été la plus active en ce qui concerne la germination des graines, entraînant une inhibition incomplète de *S. arvensis* à 0,5 µL/mL. Pour *L. sativum*, seule l'huile essentielle d'*E. oleosa* a réduit la germination des graines de 20 à 30 % à 0,75 et 1 µL/mL, respectivement. En revanche, les huiles essentielles d'*E. pimpiniana* et d'*E. polyanthemos* n'ont eu aucun effet sur la germination des graines de *L. sativum* à toutes les concentrations testées.

D'autres espèces d'Eucalyptus (*E. falcata*, *E. sideroxylon* et *E. citriodora*) introduites ont fait l'objet d'investigation allélopathique sous forme d'HEs vis-à-vis de *S. arvensis*, *P. canariensis* et *T. durum* (Amri et al., 2023). Les résultats obtenus stipulent que le potentiel phytotoxique des huiles testées avait une efficacité différente sur la germination des graines et la croissance des plantules et variait en fonction des herbes testées et de la variabilité de leur composition chimique. Leur efficacité était meilleure que celle du glyphosate (herbicide commercial).

L'ensemble de ces études souligne l'importance de considérer plusieurs facteurs dans le pouvoir allélopathique des huiles essentielles (HEs). Il est important de prendre en compte non seulement la dose appliquée, la sensibilité spécifique de la plante (adventice ou semence) ainsi que sa sélectivité (entre monoco ou dicotylédone), mais également la composition chimique et les interactions possibles (synergie, antagonisme et addition) entre les différents composants présents dans l'HE.

Les observations faites dans la présente étude sont en accord avec la majorité des travaux cités auparavant qui ont signalé que les huiles essentielles (les HEs riches en terpènes hydrocarburés) empêchent la germination et la croissance des plantes (Amri et al., 2013; Hanana et al., 2014). De même, la présence quantitative, à la fois de sesquiterpènes et de monoterpènes, et la synergie entre ces composants pourrait être à l'origine de la réduction de la germination chez les adventices de cultures (Hanana et al., 2014). D'autres chercheurs suggèrent l'implication directe du composé majoritaire de l'HE comme l'a souligné Ibáñez et

Blázquez (2018). Ainsi, aux mêmes doses et aux mêmes adventices, l'huile essentielle d'*E. globulus* contenant du 1,8-cinéole (76,43 %) n'a aucun effet phytotoxique sur la germination des graines et la croissance des semis de *P. oleracea*, tandis que l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* contenant du spathulénol (41,46 %) comme composé principal a été capable d'inhiber complètement la germination des graines de cette adventice cosmopolite.

Pour expliquer le mode d'action des HEs étudiées sur l'inhibition de la germination et comme indiqué dans la littérature, différents mécanismes physiologiques et biochimiques peuvent être expliqués par le fait que ces monoterpènes affectent les processus physiologiques, tels que la viabilité cellulaire, l'activité enzymatique et la réduction des organites suite à la rupture de la membrane (**Mahdavia et al., 2017; Fagodia et al., 2017**).

VI.2. Stade post-germination (plantule)

Cinq jours après pulvérisation des feuilles de *S. arvensis*, *P. canariensis*, *T. durum* et *R. sativus* avec les différentes doses d'HE utilisées, nous avons observé certains symptômes associés aux dommages du stress oxydatif induit par les différents traitements utilisés. Nous avons observé une chlorose suivie de l'étiollement et du flétrissement des feuilles chez certaines plantules, particulièrement chez les deux adventices et à fortes doses.

Nous avons mesuré certains paramètres biochimiques et physiologiques, indicateurs de l'état sanitaire des plantes testées, afin de mieux situer l'ampleur du stress oxydatif généré par l'application des HEs. En conséquence, des mesures ont été prises pour évaluer la teneur en eau, l'intégrité membranaire, la capacité photosynthétique (chlorophylle totale), la peroxydation lipidique (MDA), la production des ERO (H_2O_2) et la proline.

VI.2.1. Effet des HE sur l'intégrité membranaire des feuilles des plantules traitées

Étant donné que les feuilles étaient en contact direct avec les HE, entraînant une perturbation de la perméabilité des membranes cellulaires. Ce paramètre physiologique de fuite d'électrolytes à l'extérieur de la cellule peut être estimé par la mesure de l'augmentation de la conductivité électrique du milieu extracellulaire par rapport au témoin.

Le **Tableau 24** récapitule les principaux résultats obtenus pour ce paramètre avec les différentes huiles utilisées.

Activité herbicide des huiles essentielles

Tableau 24 : Effets du traitement en HE sur la fuite relative en électrolytes des feuilles des adventices et des graines cultivées.

Adv/Grn	<i>S.arvensis</i>			<i>P.canariensis</i>			<i>T.durum</i>			<i>R.sativum</i>		
<i>A.numidica</i>												
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	20,12 ± 1,22 ^{klm}	28,86± 0,20 ^j	24,89 ± 0,16 ^{jkl}	19,34 ± 0,90 ^{lmn}	28,49± 0,03 ^j	26,94 ± 0,10 ^{jk}	12,03± 0,03 ^p	12,64± 0,04 ⁿ	12,2± 0,04 ^o	12,49± 0,08 ⁿ	13,72± 0,31 ^{mn}	13,48± 0,06 ^{mn}
2	36,45 ± 0,58 ^{ghi}	44,59± 1,29 ^{def}	40,91 ± 0,16 ^{efg}	38,90 ± 0,14 ^{fgh}	46,54± 0,09 ^{cde}	42,25 ± 0,17 ^{defg}	21,52± 0,03 ^{lm}	29,96± 0,21 ^{ij}	26,51 ± 0,02 ^{jkl}	23,87 ^{lm} ± 0,34	26,96 ± 0,21 ^{jk}	25,59 ± 0,39 ^{jkl}
3	43,05± 0,84 ^{defg}	55,11± 0,10 ^{ab}	48,83 ± 1,11 ^{bcd}	44,15± 1,35 ^{def}	58,30 ± 0,14 ^a	52,16 ± 0,11 ^{abc}	34,89± 0,12 ^{ghi}	42,24 ± 0,04 ^{defg}	38,77± 1,12 ^{fgh}	41,35 ± 0,18 ^{efg}	46,31 ± 0,15 ^{cde}	44,89± 0,14 ^{def}
<i>P. nigra</i>												
Adv/Grn	<i>S. arvensis</i>			<i>P.canariensis</i>			<i>T.durum</i>			<i>R.sativum</i>		
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	18,84± 0,02 ^U	21,05 ± 0,15 ^Q	20,07 ± 0,16 ^S	13,3± 0,06 ^Y	16,49 ± 0,04 ^W	13,65 ± 0,04 ^X	11,2± 0,02 ^A	10,08± 0,02 ^{AC}	10,85 ± 0,06 ^{AB}	12,55 ± 0,02 ^Z	12,37 ± 0,02 ^Z	13,16 ± 0,02 ^Y
2	26,76± 0,02 ^M	33,8 ± 0,03 ^K	30,06 ± 0,24 ^L	22,1 ± 0,03 ^O	23,27± 0,06 ^N	23,22 ± 0,09 ^N	19,9 ± 0,07 ^S	17,60 ± 0,05 ^V	19,50± 0,04 ^T	21,35 ± 0,03 ^P	20,72± 0,07 ^R	21,19 ± 0,04 ^{PQ}
3	38,04± 0,02 ^H	46,43± 0,04 ^A	42,14± 0,04 ^B	37,1± 0,03 ^J	42,04± 0,04 ^B	40,83 ± 0,15 ^E	39,9± 0,03 ^F	37,57± 0,07 ^I	38,04 ± 0,08 ^H	41,64 ± 0,04 ^C	38,45 ± 0,05 ^G	41,05± 0,08 ^D

***Les valeurs obtenues pour les différents témoins varient entre 8 % et 8.65 % pour les différentes huiles ; Les valeurs sont des moyennes $\pm$ écarts-types (n=3); Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Les symptômes de flétrissement et de dessiccation observés chez les adventices suite à l'application de trois huiles essentielles (HEs) pourraient être attribués à une augmentation de la perméabilité membranaire, comme en témoigne l'exsudation d'électrolytes. Cette corrélation suggère que les dommages subis par les membranes cellulaires sont dose-dépendants : une concentration plus élevée d'HE entraîne une fuite d'électrolytes plus marquée, reflétant une détérioration accélérée de l'intégrité membranaire. Cette perturbation conduit inévitablement à une défaillance des fonctions cellulaires essentielles.

Les données expérimentales indiquent que les HEs de *A. numidica*, particulièrement celles extraites des branches, induisent une libération notable d'électrolytes, affectant ainsi l'intégrité des membranes cellulaires, surtout chez *S. arvensis* et, dans une moindre mesure, chez *T. durum* et *R. sativus*. Une fuite d'électrolytes croissante a été mesurée dans les feuilles soumises aux différentes HEs, avec une amplification marquée à des doses élevées pour toutes les espèces évaluées, bien que les deux espèces cultivées aient montré une certaine résistance. Sur le plan statistique, il a été constaté que les HEs perturbent significativement ($P \leq 0.05$) la membrane plasmique des adventices, entraînant une conductivité accrue dans le milieu extracellulaire. Cet effet est plus marqué chez les dicotylédones (*S. arvensis*) que chez les monocotylédones (*P. canariensis*), et ce, pour toutes les concentrations testées. Une tendance similaire a été observée lors de la comparaison entre le blé dur (*T. durum*) et le radis (*R. sativus*), avec une sensibilité différentielle à l'effet des HEs.

Pour mieux situer la variation de la fuite relative d'électrolytes engendrée par le stress oxydatif suite aux différents traitements des HEs du pin noir et du sapin, nous avons jugé utile de traiter statistiquement par une analyse de variance multifactorielle les données enregistrées. À cet effet, une analyse de variance à 3 facteurs (partie de plante où l'HE est extraite, dose appliquée et graine/semence) a été menée sur les différents traitements effectués.

Afin de caractériser la variation de la fuite d'électrolytes induite par le stress oxydatif après l'application des HEs de pin noir et de sapin de Numidie, une analyse de variance multifactorielle (ANOVA) a été appliquée aux données recueillies, prenant en compte trois facteurs principaux : la partie de la plante à partir de laquelle les HEs ont été extraites, la dose d'HEs administrée, et le type de graine ou de semence traitée. Cette méthode d'analyse a permis d'évaluer l'impact combiné et individuel de ces facteurs sur la perméabilité membranaire suite aux différents traitements par les HEs.

Pour le sapin, L'analyse de variance a montré une différence hautement significative pour l'interaction partie de la plante où l'HE est extraite * dose ($F = 6.15$; $P = 0.000$; $DDL = 4$) et, aucune différence significative entre la partie de la plante où l'HE est extraite * Adventice/semence ($F = 1.4$; $P = 0.228$; $DDL = 6$) ni de l'interaction entre Adventice/semence et la dose ($F = 1.09$; $P = 0.376$; $DDL = 6$) ni de l'interaction entre les trois facteurs ($F = 1.03$; $P = 0.427$; $DDL = 12$). En revanche, pour le pin noir, l'analyse a révélé une différence hautement significative pour toutes les interactions : partie de la plante où l'HE est extraite * dose ($F = 67.16$; $P = 0.000$; $DDL = 4$), partie de la plante où l'HE est extraite * Adventice/semence ($F = 2568.22$; $P = 0.000$; $DDL = 6$), Adventice/semence * dose ($F = 2367.24$; $P = 0.000$; $DDL = 6$) et partie de la plante où l'HE est extraite * dose * Adventice/semence ($F = 399.37$; $P = 0.000$; $DDL = 12$).

Les perturbations physiologiques estimées par les mesures des conductivités électriques au niveau des membranes cellulaires suite à l'application des HEs des deux espèces de *Pinaceae* étudiées sont attribuables au stress oxydatif induit par ces HEs, comme le rapportent plusieurs études ([Singh et al., 2006](#); [Kaure et al., 2010](#); [Benchaa et al., 2019](#); [Khammassi et al., 2023](#); [Amri et al., 2023](#)). Parmi les conséquences notables, on observe une exsudation significative d'électrolytes. L'intégrité de la membrane cellulaire est cruciale pour le maintien des fonctions vitales, notamment en agissant comme une barrière et en régulant la perméabilité sélective aux nutriments, ce qui est fondamental pour la préservation de l'homéostasie électrolytique. [Poonpaiboonpipat et al. \(2013\)](#) ont démontré que les HEs peuvent altérer la perméabilité membranaire des adventices, notamment par l'intermédiaire de la diffusion de monoterpènes à travers la paroi et les membranes cellulaires. Cette altération entraîne une fuite de potassium, ce qui peut inhiber la respiration cellulaire dépendante du glucose. En outre, l'augmentation de la perméabilité membranaire provoque également une perte accrue de solutés, ce qui perturbe les fonctions membranaires essentielles, comme l'ont souligné [Movileanu et al. \(2000\)](#). Ces modifications de la perméabilité peuvent compromettre l'équilibre ionique et énergétique de la cellule, entraînant potentiellement des effets délétères sur la viabilité cellulaire et la croissance des plantes.

VI.2.2. Effet des HEs sur la peroxydation lipidique des feuilles des plantes traitées

Les composés allélochimiques étudiés ont été identifiés comme des inducteurs de stress oxydatif au sein des plantes cibles, entraînant une perturbation généralisée des processus physiologiques et biochimiques. La membrane cellulaire, principalement constituée de phospholipides et de protéines, joue un rôle essentiel dans le maintien de la structure cellulaire et de son intégrité. Dans le cadre de cette étude, nous avons quantifié le taux de

malondialdéhyde (MDA), un biomarqueur du stress oxydatif lipidique, afin d'évaluer l'état des lipides membranaires, en particulier les phospholipides et leurs acides gras polyinsaturés. Cette mesure du MDA fournit des informations cruciales sur les dommages oxydatifs subis par les membranes cellulaires, reflétant ainsi l'impact des composés allélochimiques sur la viabilité cellulaire.

Les résultats de quantification des niveaux du MDA en fonction de la dose d'huile utilisée sur les plantes étudiées sont présentés dans le **Tableau 25** ci-dessous.

Les niveaux plus élevés de MDA semblent influencés par plusieurs facteurs, notamment la partie de la plante où l'HE a été extraite, la dose appliquée et le type de plante testée. De plus, la composition chimique de ces huiles pourrait expliquer les variations observées à la fois entre les différentes parties de la même plante et entre les deux plantes étudiées.

L'analyse statistique par le billet et la variance multifacteurs nous a aidé à mieux voir la contribution de chaque élément de l'expérience et/ou de leur interaction dans la variation des taux du MDA enregistré. Celle-ci a révélé, pour *P. nigra*, une différence hautement significative pour les interactions binaires entre : partie de la plante où l'E est extraite * dose ($F=28.21; P=0.000; DDL=4$), partie de la plante où l'huile est extraite * Adventice/semence ($F=143.28; P=0.000; DDL=6$) et Adventice/semence et la dose ($F=4783.77; P=0.000; DDL=6$) et l'interaction globale entre les trois facteurs ($F=16.22; P=0.427; DDL=12$). De même, pour *A. numidica*, une différence hautement significative pour toutes les interactions : partie de la plante où l'E est extraite * dose ($F=29.71; P=0.000; DDL=4$), partie de la plante où l'E est extraite * Adventice/semence ($F=59.53; P=0.000; DDL=6$) et Adventice/semence et la dose ($F=2137.44; P=0.000; DDL=6$) et l'interaction globale entre les trois facteurs ($F=11.71; P=0.427; DDL=12$).

Activité herbicide des huiles essentielles

Tableau 25 : Teneurs (nmol/g MF) et évolution du MDA dans les feuilles des plantes traitées par les différentes HE étudiées.

Adv/Grn	S.arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
A. numidica												
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	16,23 ± 0.003 ^M	20,13 ± 0.04 ^K	18,14 ± 0.04 ^L	11,45 ± 0.03 ^R	16,24 ± 0.04 ^M	12,61 ± 0.04 ^{PQ}	9,27 ± 0,05 ^U	11,90 ± 0,16 ^Q	10,94 ± 0,07 ^S	10,50 ± 0,02 ^T	12,75 ± 0,03 ^P	11,93 ± 0,13 ^Q
2	23,07 ± 0,02 ^J	30,09 ± 0,03 ^G	28,06 ± 0,05 ^H	26,0 ± 0,04 ^I	35,36 ± 0,04 ^E	31,16 ± 0,25 ^F	10,88 ± 0,12 ^S	12,45 ± 0,03 ^{PQ}	11,57 ± 0,06 ^R	11,95 ± 0,07 ^Q	14,95 ± 0,11 ^N	14,00 ± 0,09 ^O
3	40,13 ± 0.23 ^C	45,08 ± 0.03 ^A	42,11± 0.03 ^B	36,4 ± 0,53 ^D	44,70 ± 0,05 ^A	42,04 ± 0.03 ^B	11,95 ± 0,06 ^Q	14,93 ± 0,10 ^N	13,90 ± 0,09 ^O	12.93 ± 0,12 ^P	16.74 ± 0,05 ^M	16.08 ± 0,03 ^M
P. nigra												
Adv/Grn	S. arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	14,05 ± 0,13 ^O	19,27 ± 0,06 ^K	16,22 ± 0,02 ^L	10,3 ± 0,02 ^W	15,07 ± 0,04 ^M	12,13± 0,03 ^{QRS}	9,14 ± 0,22 ^X	11,04 ± 0,19 ^U	10,81± 0,03 ^{VW}	10,35 ± 0,03 ^W	12,46± 0,03 ^Q	11,65 ± 0,03 ST
2	22,10 ± 0,26 ^J	28,12 ± 0,19 ^G	26,23 ± 0,30 ^H	24,9 ± 0,11 ^I	33,52 ± 0,02 ^E	30,05 ± 1.46 ^F	10,78 ± 0,03 ^{VW}	12,25 ± 0,04 ^{QR}	11,39 ± 0,03 ^T	11,80 ± 0,04 ^{RST}	14,31 ± 0,06 ^{NO}	13,97 ± 0,13 ^{OP}
3	38,94± 0,23 ^C	44,09 ± 0,03 ^A	40,22 ± 0,36 ^B	36,1 ± 0,22 ^D	44,08 ± 0,03 ^A	40,52 ± 0,67 ^B	11,44 ^T ± 0,05	14,42 ± 0,03 ^{NO}	13,52 ± 0,04 ^P	12,55± 0,06 ^Q	16,36± 0,06 ^L	14,77± 0,04 ^{MN}

******Les valeurs obtenues pour les différents témoins varient entre 8,2 nmol/g et 10 nmol/g de feuilles pour les différentes huiles; Les valeurs sont des moyennes ± écarts-types (n=3); Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

La peroxydation lipidique est un processus par lequel les lipides subissent une dégradation oxydative, et le malondialdéhyde (MDA) est un marqueur clé de ce phénomène, généralement mesuré par le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) (Marnett, 1999). Étant donné que les acides gras et autres lipides sont des constituants structuraux essentiels des membranes cellulaires, il est plausible de postuler que leur dégradation oxydative pourrait libérer des lipides dans le cytoplasme des cellules affectées, où ils pourraient subir une oxydation supplémentaire (Scrivanti et al., 2003). Cette libération de lipides et la peroxydation qui en résulte, accompagnées d'une fuite accrue d'électrolytes, contribuent à la perte d'intégrité membranaire, ce qui est reconnu comme un facteur déterminant dans l'induction de dommages cellulaires (Singh et al., 2006). Par conséquent, la membrane cellulaire joue un rôle prépondérant dans la médiation des effets des composés bioactifs, agissant comme un indicateur sensible des perturbations induites par ces agents. La détermination du mode d'action des composés bioactifs passe donc inévitablement par l'analyse de l'état des membranes cellulaires, notamment à travers l'évaluation des niveaux de MDA. Cette approche permet de déceler les altérations membranaires précoces qui peuvent signaler des dysfonctionnements cellulaires et, par extension, des effets phytotoxiques des composés allélochimiques sur les plantes cibles.

L'augmentation des taux de MDA constatée chez les différentes espèces signifie la présence d'un stress oxydatif suite au traitement par les HEs, se manifestant par la dégradation des composants clés des membranes cellulaires, tels que les lipides et les acides gras insaturés. Cette détérioration membranaire est particulièrement marquée chez *S. arvensis*, suivie de *P. canariensis*, tandis que le blé dur et le radis cultivé affichent une résilience relative, suggérant une meilleure capacité à faire face au stress induit. L'analyse des données révèle une corrélation entre la perte d'intégrité membranaire et l'augmentation des taux de MDA, les espèces présentant les perturbations membranaires les plus sévères affichant également les niveaux les plus élevés de MDA. Dans cette optique, divers travaux ont proposé que les huiles essentielles (HEs) riches en monoterpènes sont susceptibles d'engendrer un stress oxydatif se traduisant par une production accrue de malondialdéhyde (Hanana et al., 2014; Amri et al., 2017; Benchaa et al., 2019; Benkaabet al., 2019; Amri et al., 2023). Cette hypothèse est corroborée par les résultats obtenus dans la présente étude avec les HEs de *P. nigra* et d'*A. numidica*. Par ailleurs, d'autres recherches ont mis en évidence le rôle prépondérant des dérivés oxygénés des HEs et l'influence directe du composé majoritaire dans l'induction du stress oxydatif (Zhang et al., 2014). Synowiec et al. (2017) ont également souligné l'importance des composés majoritaires dans l'activité biologique des HEs, tout en reconnaissant les effets synergiques potentiels des composés mineurs. Ces interactions complexes entre les différents constituants des HEs

peuvent donc jouer un rôle déterminant dans la réponse au stress oxydatif et dans les mécanismes de toxicité vis-à-vis des plantes cibles.

VI.2.3. Effet des HE sur la production du H_2O_2 dans les feuilles des plantes traitées

Le stress oxydatif a été reconnu après les traitements aux HEs par le biais du produit de peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA), du peroxyde d'hydrogène et de la proline.

La génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) était l'un des principaux mécanismes d'action des phytotoxines, qui peuvent induire une production incontrôlée de H_2O_2 dans les tissus végétaux, entraînant des perturbations cellulaires (Singh *et al.*, 2006, 2009 ; Mutlu *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus (Tableau 26) soulignent une forte corrélation entre l'accumulation de H_2O_2 , la fuite d'électrolytes et le taux de malondialdéhyde (MDA). L'augmentation des taux de production de H_2O_2 observée chez les différentes espèces indique la présence d'un stress oxydatif induit par les traitements avec les différentes HEs. Ce stress se traduit au niveau cellulaire par la dégradation des principaux constituants membranaires (lipides et acides gras insaturés). Cette production semble plus forte chez les dicotylédones (*S. arvensis*) que chez les monocotylédones (*P. canariensis*), tandis que les deux semences cultivées semblent mieux résister au stress.

Initialement, la teneur en peroxyde d'oxygène (H_2O_2) dans les plantes adventices était faible (déterminée en condition témoin), mais suite à l'application des HEs, une nette augmentation des niveaux a été observée, indépendamment de la plante testée et de l'HE utilisée. À la dose la plus élevée, la production de H_2O_2 a doublé voire triplé pour certaines plantes étudiées.

L'analyse de la variance multifactorielle (3 facteurs) a apporté des éléments clés sur la contribution de chaque composant et de leurs interactions dans la variation de production du H_2O_2 enregistrée. Pour *P. nigra*, elle a révélé des différences hautement significatives pour les interactions binaires entre la partie de la plante où l'HE est extraite et la dose ($F=1394.97$; $P=0.000$; DDL = 4), la partie de la plante où l'HE est extraite et le type de plante (adventice/semence) ($F=1189.71$; $P=0.000$; DDL = 6), le type de plante et la dose ($F=28246.20$; $P=0.000$; DDL = 6) ainsi que l'interaction globale entre ces trois facteurs ($F=1726.07$; $P=0.000$; DDL = 12). Pour les HEs de *A. numidica*, l'ANOVA a révélé des différences hautement significatives pour les interactions binaires entre la partie de la plante où l'HE est extraite et la dose ($F=985.57$; $P=0.000$; DDL=4), la partie de la plante où l'HE est

extraite et le type de plante (adventice/semence) ($F=826.30$; $P=0.000$; $DDL=6$), le type de plante et l'adose ($F = 12761.30$; $P= 0.000$; $DDL = 6$) ainsi que l'interaction globale entre ces trois facteurs ($F = 673.71$; $P = 0.000$; $DDL= 12$).

Activité herbicide des huiles essentielles

Tableau 26 : Teneurs (nmol/g MF) et évolution de H₂O₂ dans les feuilles des plantes traitées par les différentes HE étudiées.

Adv/Grn	S.arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
A.numidica												
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	4,03± 0.003 ^{MN}	4,52± 0.04 ^L	4,25± 0.02 ^M	3,52± 0.03 ^P	4,73± 0.04 ^{KL}	4,15± 0.03 ^{MNO}	2,02± 0,04 ^S	3,61± 0,03 ^P	2,91± 0,02 ^Q	2,62± 0,02 ^R	4,52± 0,02 ^L	3,52± 0,04 ^P
2	4,21± 0,04 ^{MN}	6,09± 0,03 ^H	4,65± 0,02 ^{KL}	5,24± 0,02 ^I	15,20± 0,19 ^E	13,01± 0,18 ^F	2,12± 0,01 ^S	3,95± 0,03 ^O	3,61± 0,03 ^P	2,82± 0,04 ^{QR}	4,82± 0,04 ^{JK}	3,93± 0,04 ^O
3	11,61± 0.05 ^G	20,16± 0.04 ^B	17,13 ±0.03 ^D	15,33± 0,04 ^E	22,30± 0,09 ^A	18,14± 0,14 ^C	2,62± 0,03 ^R	4,20± 0,04 ^{MN}	4,02± 0,03 ^{NO}	2,96± 0,03 ^{QR}	5,02± 0,01 ^J	4,81± 0,01 ^{JK}
P. nigra												
Adv/Grn	S. arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
Organe Dose	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	3,10± 0,20 ^{OP}	4,23± 0,03 ^J	3,21± 0,02 ^O	2,32± 0,02 ^S	3,43± 0,03 ^N	2,63± 0,04 ^R	1,52± 0,04 ^V	3,13± 0,05 ^{OP}	2,86± 0,04 ^P	2,10± 0,04 ^T	4,05± 0,02 ^K	3,16± 0,03 ^{OP}
2	4,08± 0,04 ^K	5,03± 0,07 ^G	4,30± 0,02 ^H	4,22± 0,04 ^J	13,08± 0,11 ^D	12,7± 0,02 ^E	1,84± 0,07 ^U	3,39± 0,03 ^N	3,54 ^M ±0,04	2,39± 0,03 ^S	4,32± 0,06 ^{GH}	3,83± 0,06 ^L
3	11,02± 0,04 ^F	18,05± 0,11 ^A	15,3± 0,04 ^B	14,18± 0,04 ^C	18,14± 0,07 ^A	15,4± 0,05 ^B	2,12± 0,04 ^T	3,60± 0,02 ^M	3,98 ^J ± 0,01	2,92± 0,04 ^Q	4,79± 0,04 ^H	4,47± 0,05 ^I

****** Les valeurs obtenues pour les différents témoins varient entre 0,05 nmol/g et 0,1 nmol/g de matière fraîche pour les différentes huiles; Les valeurs sont des moyennes ± écarts-types (n=3) ; Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Comme précédemment, avec la fuite relative d'électrolytes et les niveaux du MDA, la production de H_2O_2 semble être liée à la composition chimique des HEs étudiées.

Plusieurs travaux scientifiques ont mis en exergue le rôle phytotoxique de l'application des HEs sur les adventices de culture (Singh *et al.*, 2006, 2009 ; Mutlu *et al.*, 2011, Ben kaab *et al.*, 2019). Ces molécules génèrent un stress oxydatif induit par une production incontrôlée des espèces réactives à l'oxygène, au niveau des photosystèmes I et II et de la chaîne de transport d'électrons dans les chloroplastes (Smirnoff & Arnaud, 2019).

Mutlu *et al.* (2011) ont montré que l'accumulation de H_2O_2 est fortement corrélée à celle de MDA et à la fuite d'électrolytes. En fait, l'excès de H_2O_2 peut réagir avec les phospholipides de la bicouche membranaire, augmentant la peroxydation des lipides et le stress oxydatif. Ce que nous avons constaté dans nos expériences avec les HEs étudiées.

Smirnoff & Arnaud (2019) suggèrent qu'un faible niveau de H_2O_2 peut être piégé par les multiples défenses antioxydantes des plantes ; cependant, sa production incontrôlée peut endommager les composants cellulaires. Ceci expliquerait probablement nos observations concernant les taux de H_2O_2 dans les semences cultivées.

VI.2.4. Effet des HEs sur l'accumulation de proline au niveau des feuilles des plantules traitées

Chez les plantes, la proline fonctionne comme un médiateur de l'ajustement osmotique, de l'intégrité et de la protection de la membrane plasmique. Son accumulation pourrait être liée à l'augmentation de l'hydrolyse des protéines causée par le stress (Singh *et al.*, 2020).

L'acide aminé protéinogène que est la proline joue le rôle d'osmolyte, de piègeur de radicaux, de puits d'électrons, de stabilisateur de macromolécules et de composant de la paroi cellulaire (Lei *et al.*, 2019). Elle est l'une des stratégies des plantes pour éviter, détoxifier et réparer les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (Weir *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2008).

Les différentes HEs testées ont induit une accumulation significative de proline dans les feuilles de toutes les adventices. L'augmentation de la teneur en proline était dépendante de la concentration. À la faible dose, pour les HEs des deux Pinaceae, l'augmentation par rapport au contrôle était de 1.56 à 4 fois pour les aiguilles, de 1.79 à 5.77 fois pour les branches et de 1,78 à 5.33 fois pour les cônes. Quant au blé dure et au radis, la teneur est beaucoup plus meilleure à la faible dose appliquée et en revanche les taux ont été ramenés aux mêmes niveaux que les adventices à la plus forte dose et pour toutes les HEs appliquées (Tableau 27).

Une analyse de variance à trois facteurs a été menée pour décomposer la contribution de chaque variable et de leurs interactions dans la variation de la proline accumulée dans les feuilles des plantes étudiées. Cette analyse a révélé des différences statistiquement significatives pour les deux plantes examinées, en tenant compte des interactions binaires et globales entre les variables pour les deux espèces de *Pinaceae* :

1. Pour *P. nigra*, les différences sont hautement significatives : la partie de la plante où l'HE est extraite et la dose ($F = 24.81$; $P = 0.000$; $DDL = 4$), la partie de la plante et l'adventice/semence ($F = 31.25$; $P = 0.000$; $DDL = 6$), le type de plante (adventice/semence) et la dose ($F = 377.75$; $P = 0.000$; $DDL = 6$) et l'interaction globale entre ces trois facteurs ($F = 17.95$; $P = 0.000$; $DDL = 12$).

Pour *A. numidica*, les différences sont hautement significatives pour : la partie de la plante où l'HE est extraite et la dose ($F = 10.43$; $P = 0.000$; $DDL = 4$) et le type de plante (adventice/semence) et la dose ($F = 28.43$; $P = 0.000$; $DDL = 6$). En revanche, pour la partie de la plante où l'huile est extraite* l'adventice/semence ($F = 2.87$; $P = 0.015$; $DDL = 6$), les différences sont statistiquement significatives, et aucune différence significative pour l'interaction globale entre ces trois facteurs ($F = 1.81$; $P = 0.062$; $DDL = 12$).

Activité herbicide des huiles essentielles

Tableau 27: Effets des différentes HES étudiées sur l'accumulation de la proline dans les feuilles des plantes testées.

Adv/Grn	S.arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
A. Numidica												
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	80,10± 0,56 ^S	102,50± 0,62 ^R	85,00± 0,5 ^U	123,53± 0,5 ^Q	153,8± 0,17 ^{NO}	136,6± 7,54 ^{PQ}	138,97± 5,07 ^{OP}	162,6± 0,02 ^{MN}	154,5± 0,36 ^{NO}	152,3± 0,3 ^{NOP}	182,47± 0,25 ^{LJK}	163,13± 0,12 ^{MN}
2	150,83± 0,4 ^{NOP}	182,33± 0,31 ^{LJK}	173,43± 0,32 ^{KLM}	191,43± 0,21 ^{GHJ}	202,17± 0,67 ^{FG}	198,2± 3,55 ^{FGH}	158,17± 0,25 ^{MN}	191,17± 0,31 ^{GHJ}	186,2± 0,02 ^{HJ}	194,43± 0,25 ^{EFG}	231,33± 0,31 ^D	197,87± 0,35 ^{FGHI}
3	181,37± 0,86 ^{JKL}	220,27± 0,23 ^{DE}	195,47± 1,10 ^{FGHIJ}	224,57± 0,35 ^D	265,8± 5,52 ^A	247,3± 2,77 ^{BC}	163,63± 0,31 ^{MN}	233,33± 0,47 ^{CD}	207,7± 0,3 ^{EF}	228,97± 1,12 ^{FG}	260,57± 0,15 ^{AB}	232,43± 0,29 ^{CD}
P. nigra												
Adv/Grn	S. arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	74,9± 0,3 ^V	89,7± 0,56 ^T	83,53± 0,35 ^S	103,77± 0,15 ^S	135,33± 0,31 ^P	116,9± 0,2 ^R	123,4± 0,36 ^Q	158,3± 0,46 ^N	153,27± 0,25 ^O	134,43± 0,21 ^P	165,33± 0,42 ^L	155,73± 7,01 ^{NO}
2	136,43± 0,25 ^P	167,5± 0,26 ^{KL}	155,5± 0,3 ^{NO}	155,47± 0,25 ^{NO}	190,27± 0,95 ^{GH}	168,97± 0,31 ^K	155,37± 0,15 ^{NO}	181,43± 1,68 ^J	164,8± 0,2 ^L	161,03± 2,12 ^M	205,9± 6,11 ^E	188,87± 3,01 ^{HI}
3	168,37± 1,65 ^K	194,57± 0,21 ^F	180,97± 1,46 ^J	187,03± 0,15 ^I	228,23± 0,4 ^B	208,9± 0,2 ^D	192,47± 0,04 ^{FG}	230,07± 0,44 ^{AB}	216,37± 0,32 ^C	194,23± 0,21 ^F	232,53± 0,25 ^A	206,53± 0,25 ^{DE}

****Les valeurs obtenues pour les différents témoins varient entre 15.25 µg/get 45 µ/g de matières sèche pour les différentes huiles; Les valeurs sont des moyennes ± écarts-types (n=3) ; Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher (P ≤ 0,05).**

La proline est un soluté compatible et une molécule largement étudiée dans les plantes soumises à un stress abiotique (Verslues and Sharma, 2010; Barupal et al., 2019). Il a été documenté que les huiles essentielles et leurs composants individuels, tels que le α -pinène, augmentent les niveaux de proline, qui agit comme un récepteur d'électrons et prévient les dommages aux membranes (Amri et al., 2012; Sunohara et al., 2015). Cela indique également que, dans notre étude, les adventices et les semences peuvent éviter plus efficacement les dommages causés par les monoterpènes provenant des HEs étudiées. En outre, l'augmentation de la teneur en proline peut être reliée à la réponse à l'augmentation de la concentration en espèces réactives de l'oxygène et peut également constituer une barrière physique contre les monoterpènes (Amri et al., 2012).

VI.2.5. Effet des HEs sur la teneur en chlorophylle totale des plantes traitées

L'observation de chlorose et de nécrose dans le feuillage des plantules post-traitement avec les différentes HEs témoigne d'une altération de l'intégrité membranaire des tissus de ces végétaux. Cette détérioration est indicative d'une interférence des HEs avec les voies du métabolisme photosynthétique.

L'analyse quantitative de la chlorophylle totale (Tableau 28) a révélé une diminution significative de la capacité photosynthétique des plantes suite à leur pulvérisation avec les HEs étudiées, avec une relation dose-dépendante. Cinq jours après l'application des HEs à faible dose (dose minimale), on a constaté une réduction supérieure à 30 % de la teneur en chlorophylle chez *S. arvensis* et chez les deux autres espèces de plantes cultivées. *P. canariensis* a affiché une vulnérabilité marquée, subissant une réduction de 50 % de la chlorophylle totale dès la première dose, en comparaison avec les plantes non traitées. Lorsque les concentrations des HEs étaient élevées, les HEs extraites des aiguilles des deux espèces de Pinaceae ont considérablement inhibé la synthèse de chlorophylle chez les plantules adventices, alors que les cônes et les branches présentaient une moindre efficacité sur la capacité photosynthétique des plantes traitées. Le blé dur et le radis ont montré une résistance relative (tolérance partielle), avec une baisse graduelle de la chlorophylle qui ne s'intensifiait pas de manière proportionnelle à l'augmentation des doses des HEs appliquées.

L'analyse de la variance multifactorielle (3 facteurs) a apporté des éléments clés sur la contribution de chaque composant et de leurs interactions dans la variation de la synthèse chlorophyllienne. Pour *P. nigra*, elle a révélé des différences hautement significatives pour les interactions binaires entre la partie de la plante où l'huile est extraite et la dose ($F = 15.6$; $P = 0.000$; $DDL = 4$), la partie de la plante où l'huile est extraite et le type de plante

(adventice/semence) ($F=171.00$; $P=0.000$; $DDL=6$), ainsi que le type de plante et la dose ($F=308.21$; $P=0.000$; $DDL=6$) ainsi que l'interaction globale entre ces trois facteurs ($F=66.85$; $P=0.000$; $DDL=12$). Par contre, pour les HEs de *A. numidica*, l'ANOVA a révélé des différences hautement significatives pour les interactions binaires entre la partie de la plante où l'huile est extraite et la dose ($F=8.90$; $P=0.000$; $DDL=4$), le type de plante et la dose ($F=7.88$; $P=0.000$; $DDL=6$) et une différence significative entre la partie de la plante où l'huile est extraite et le type de plante (adventice/semence) ($F=3.06$; $P=0.010$; $DDL=6$) et, aucune différence significative entre les trois facteurs ($F=1.61$; $P=0.108$; $DDL=12$).

Activité herbicide des huiles essentielles

Tableau 28 : Effet des HE sur la teneur en chlorophylle totale ($\mu\text{g/g}$ de feuilles) des plantes étudiées.

Adv/Grn	<i>S.arvensis</i>			<i>P.canariensis</i>			<i>T.durum</i>			<i>R.sativum</i>		
A. <i>numidica</i>												
Organe Dose (µL/mL)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	8,07 ± 0,02 ⁱ	8,84 ± 0,02 ^e	8,42 ± 0,03 ^g	4,68 ± 0,02 ^q	6,68± 0,02 ^{lmn}	6,34 ± 0,05 ^{lmno}	8,82± 0,04 ^e	10,80 ± 0,04 ^a	10,13± 0,03 ^b	8,02± 0,02 ⁱ	9,65 ± 0,67 ^c	9,20 ± 0,52 ^d
2	6,23± 0,03 ^{mno}	7,01 ± 0,55 ^k	6,64± 0,02 ^{lmn}	4,04 ± 0,02 ^s	5,53± 0,04 ^{no}	5,11 ± 0,03 ^o	6,60± 0,03 ^{lmn}	8,64± 0,02 ^f	8,07± 0,02 ⁱ	6,45± 0,03 ^{lmno}	8,25 ± 0,55 ^h	7,78 ± 0,21 ^{jk}
3	4,32 ± 0,04 ^r	6,23 ± 0,03 ^{mno}	4,78 ± 0,04 ^q	2,83 ± 0,05 ^t	5,13 ± 0,03 ^o	5,02± 0,11 ^p	5,52 ± 0,04 ^{no}	7,49 ± 0,04 ^{jk}	6,28 ± 0,05 ^{mno}	5,86 ± 0,07 ^{no}	7,97 ± 0,01 ⁱ	6,62± 0,03 ^{lmn}
P. <i>nigra</i>												
Adv/Grn	<i>S. arvensis</i>			<i>P.canariensis</i>			<i>T.durum</i>			<i>R.sativum</i>		
Organe Dose (µL/ml)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	6,16 ± 0,10 ^J	7,14 ± 0,08 ^G	6,63 ± 0,04 ^I	5,04 ± 0,02 ^{OP}	6,60 ± 0,02 ^I	6,28 ± 0,03 ^J	8,12 ± 0,02 ^E	10,43 ± 0,04 ^A	7,67 ± 0,03 ^F	7,78 ± 0,04 ^F	9,24 ± 0,04 ^B	8,90 ±0,04 ^C
2	4,09 ± 0,20 ^T	5,30 ± 0,04 ^M	4,28 ± 0,32 ^{RS}	4,87± 0,15 ^Q	5,28± 0,03 ^{NM}	4,98 ± 0,15 ^{OPQ}	6,22± 0,02 ^J	8,59 ± 0,08 ^D	6,72 ± 0,02 ^{HI}	5,40± 0,05 ^{LM}	8,91± 0,04 ^C	6,80±0,03 ^H
3	2,85± 0,05 ^{UV}	3,13 ± 0,16 ^U	2,97± 0,22 ^V	4,14± 0,02 ^S	5,64 ± 0,04 ^K	5,11± 0,03 ^{NO}	4,34 ^R ± 0,02	6,72± 0,02 ^{HI}	5,47± 0,02 ^L	4,82 ± 0,03 ^Q	6,67± 0,02 ^{HI}	4,92 ±0,03 ^{PQ}

****** Les valeurs obtenues pour les différents témoins varient entre 10.85 $\mu\text{g/g}$ de feuilles et 12.65 $\mu\text{g/g}$ de feuilles pour les différentes huiles; Les valeurs sont des moyennes $\pm$ écarts-types ($n=3$) ; Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

La variation observée souligne que l'application des HEs réduit la teneur en chlorophylle de manière dose-dépendante, affectant ainsi la fonction photosynthétique des plantes étudiées. La sensibilité à cette réduction montre une spécificité interspécifique face aux effets phytotoxiques des HEs utilisées notamment chez les adventices. Quant au blé dur et au radis cultivé, il semble que ces deux espèces possédaient des mécanismes de résilience qui atténuaient l'impact des concentrations élevées de ces substances. De plus, nous avons noté un lien fort entre la fuite relative d'électrolytes, les niveaux de proline, de MDA, de H_2O_2 et la réduction de la synthèse chlorophyllienne chez les plantes traitées. Contrairement aux précédents effets phytotoxiques mesurés, nous avons remarqué que les HEs présentant une fraction élevée en sesquiterpènes provoquaient plus de réduction de la synthèse chlorophyllienne, suggérant que les composants spécifiques des HEs jouent un rôle déterminant dans leur capacité à interférer avec la photosynthèse des plantes.

Dans ce contexte, plusieurs études ont montré le potentiel herbicide des HEs et leurs composés purs dans l'inhibition de la photosynthèse suite à l'inhibition de la synthèse des pigments chlorophylliens. En effet, [Kaur et ses collègues \(2010\)](#) ont montré que l'application des HEs d'*Artemisia scoparia* contre cinq mauvaises herbes induisait une perte de chlorophylle et de respiration cellulaire. L'huile essentielle d'Eucalyptus citronné a montré un effet allélopathique négatif qui interfère avec la germination des graines et la croissance des plantules de nombreuses adventices de culture et a révélé une forte réduction de la teneur en chlorophylle et de l'activité respiratoire d'un large spectre de plantes adventices ([Vishwakarma & Mittal, 2014](#); [Ootani et al., 2017](#); [Benchaa et al., 2018](#)). De même, [Amri et al. \(2023\)](#) ont démontré que les huiles de trois espèces d'Eucalyptus ont fortement réduit la synthèse de la chlorophylle chez *S. arvensis*, *P. canariensis* et *T. durum* comparativement au glyphosate. Bien que, dans la présente étude, la diminution de la teneur en chlorophylle n'ait pas été déterminée si elle était due à l'inhibition de la synthèse de la chlorophylle ou à la dégradation de la chlorophylle existante. Selon des travaux antérieurs, elle peut être causée par l'action des monoterpènes qui interfèrent avec la machinerie photosynthétique des plantes et empêchent la synthèse de la chlorophylle ou stimulent sa dégradation ([Dankov et al., 2009](#)), ou spécifiquement par la capture d'électrons au cours de la photosynthèse et la formation de radicaux libres responsables de la peroxydation des lipides ([Liu & Lu, 2016](#)).

VI.2.6. Effet des HE sur la teneur en eau des plantules traitées

En plus de la chlorose et de l'étiollement des feuilles, nous avons observé un flétrissement variable chez les plantules traitées avec les différentes HEs. Ce dernier n'est que le résultat de l'interruption de l'intégrité des membranes cellulaires accentuée par la fuite relative d'électrolytes. De même, il nous informe sur l'état du potentiel hydrique de ces plantules. Afin d'élucider les mécanismes sous-jacents à la déshydratation observée, la teneur relative en eau des plantules a été quantifiée cinq jours après l'application des HEs à différentes concentrations. Les données obtenues, présentées dans le **Tableau 29**, fournissent un aperçu quantitatif de l'impact hydrique des HEs sur les plantules étudiées.

Le statut hydrique des plantules traitées varie de manière dose-dépendante. Une perte en eau relativement faible a été notée pour la faible dose et avec toutes les huiles étudiées. Plus la concentration en huile est élevée, plus la perte en eau est grande. À la plus forte dose, la teneur en eau des plantules traitées a diminué de 25 % à 40 % par rapport aux plantules non traitées. Par ailleurs, une chute plus marquée avec toutes les huiles et, particulièrement celles des branches des deux Pinaceae, a été observée chez les monocotylédones comparativement aux dicotylédones. Cette distinction entre les classes de plantules suggère une interaction spécifique entre la composition des HEs et les mécanismes de réponse au stress hydrique des monocotylédones et dicotylédones.

La variation enregistrée a été statistiquement analysée pour mieux comprendre l'influence de chaque élément expérimental dans la fluctuation des teneurs en eau chez les plantules étudiées. Les résultats de cette dernière, pour les HEs de *P. nigra*, ont révélé des différences hautement significatives pour les interactions binaires entre la partie de la plante où l'huile est extraite et la dose ($F=63.86$; $P=0.000$; $DDL=4$), la partie de la plante où l'huile est extraite et le type de plante (adventice/semence) ($F=27.05$; $P=0.000$; $DDL=6$) et le type de plante et la dose ($F=1.09$; $P=0.376$; $DDL=6$) ainsi que l'interaction globale entre ces trois facteurs ($F=160.86$; $P=0.000$; $DDL=12$). La même signification statistique a été révélée pour les HEs d'*A. numidica*. Pour les interactions binaires entre la partie de la plante où l'huile est extraite et la dose ($F=22.7$; $P=0.000$; $DDL=4$), la partie de la plante où l'huile est extraite et le type de plante (adventice/semence) ($F=9.54$; $P=0.000$; $DDL=6$), ainsi que le type de plante et la dose ($F=19.70$; $P=0.000$; $DDL=6$) et l'interaction globale entre ces trois facteurs ($F=3.33$; $P=0.001$; $DDL=12$).

Activité herbicide des huiles essentielles

Tableau 29 : Effets des HE sur la teneur relative en eau chez les plantes étudiées.

Adv/Gr	S.arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
A. numidica												
Organe Dose (µL/ml)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	90,2± 0,2 ^{ABC}	87,01± 0,99 ^{CDE}	88,38± 0,06 ^{BCDE}	92,2± 1,98 ^A	88,35± 0,17 ^{BCDE}	90,8 ^{AB} ± 0,40	90,37± 0,15 ^{ABC}	88,50± 0,13 ^{BCD}	90,28± 0,10 ^{ABC}	92 ^A ± 0.00	90,17± 0,14 ^{ABC}	90,43±0,03 ^{ABC}
2	86,62 ± 0,13 ^{CD} ^E	82,32± 0,13 ^{HIJK}	84,75± 0,3 ^{EFG}	86,9± 0,13 ^{CDE}	78,58± 0,18 ^{MN}	82,17± 0,14 ^{HIJK}	86,43± 0,13 ^{DEF}	82,55± 0,17 ^{HIJ}	84,17± 0,14 ^{GHI}	90,17± 0,10 ^{ABC}	86,50± 0,05 ^{DEF}	88,51± 0,10 ^{BCD}
3	78,55 ±0,05 ^{MN}	72,37± 0,10 ^P	74,92± 0,29 ^O	80,9± 0,46 ^{IJKL}	65,13 ^Q ± 0,79	78,55± 0,13 ^{MN}	80,50± 0,13 ^{JKL}	76,80± 0,40 ^{NO}	80,23± 0,03 ^{KL}	86,58± 0,16 ^{DEF}	78,65± 0,15 ^{LM}	82,67± 0,10 ^{HIJ}
P. nigra												
Adv/Gr	S. arvensis			P.canariensis			T.durum			R.sativum		
Organe Dose (µL/ml)	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes	Aiguilles	Branches	Cônes
1	88,45± 0,2 ^B	86,58± 0,91 ^C	86,9± 0,45 ^C	90,4± 0,2 ^A	88,47± 0,28 ^B	90,1± 0,13 ^A	90,4± 0,15 ^A	88,4± 0,13 ^B	90± 1,10 ^A	90,75± 0,00 ^A	90,42± 0,29 ^A	90,52± 0,12 ^A
2	82,53± 0,08 ^D	80,89± 0,98 ^E	82,1± 0,13 ^D	80,7± 0,41 ^E	73,57± 0,10 ^I	78,6± 0,09 ^F	88,65± 0,00 ^B	80,3± 1,90 ^E	88,25± 0,25 ^B	88,63± 0,13 ^B	86,43± 0,16 ^C	88,05± 1,21 ^B
3	74,42± 0,23 ^{HI}	72,4 ^J ± 0,13	72,62 ^J ±0,06	78,5± 0,13 ^F	72,57± 1,38 ^J	74,53± 0,08 ^H	82,32± 0,13 ^D	76,30± 0,13 ^G	76,55± 0,10 ^G	80,37± 0,10 ^E	74,38± 0,13 ^{HI}	78,57± 0,08 ^F

******Les valeurs obtenues pour les différents témoins varient entre 90 % et 92.25 % pour les différentes huiles ; Les valeurs sont des moyennes $\pm$ écarts-types (n=3); Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test de LSD de Fisher ($P \leq 0,05$).

Bien que les effets phytotoxiques du traitement des plantes avec les HEs induit un stress oxydatif ciblant plusieurs compartiments cellulaires. La propagation du stress engendre plusieurs interruptions dans le fonctionnement de la cellule et l'altération de l'état hydrique de la plante est un phénomène couramment observé chez les plantes adultes traitées avec des terpénoïdes (Schulz et al., 2007).

Bainard et al. (2006) ont souligné que la quantité de cires épicuticulaires des feuilles détermine la sensibilité des semis de plantes cultivées et des espèces adventices. L'effet délétère des monoterpènes (camphre et menthol) sur la cire cuticulaire et l'inhibition de la fermeture des stomates ont été observés après traitement des plantes par les HEs (Schulz et al., 2007). Ces deux effets agissent en synergie sur la transpiration de la plante, entraînant la rupture des cellules de garde et la dessiccation (Kreigs et al., 2010).

Il a été également rapporté, dans une autre étude, que l'altération de l'état hydrique des plantes a été observée après l'arrosage des racines avec du citral, un mélange de deux isomères monoterpéniques, le *nérol* et le *géraniol* (Grana et al., 2016). Dans une étude similaire avec le sesquiterpène *trans*-caryophyllène, les auteurs suggèrent que cette altération pourrait être responsable d'une altération oxydative généralisée et d'une forte accumulation de proline en raison de sa fonction osmo-régulatrice (Araniti et al., 2017).

En conclusion, la phytotoxicité des HEs des Pinaceae étudiées sur les espèces adventices et les autres semences vivrières a affecté à la fois la germination des graines mais aussi le stade post-germination. L'efficacité de ces huiles dépend de la plante testée et de la dose appliquée. Cette efficacité est modulée par la composition chimique des HEs étudiées, en particulier la présence et l'interaction des fractions terpéniques. Les HEs riches en monoterpènes se sont révélées particulièrement phytotoxiques, avec une action sélective notable entre les monocotylédones et les dicotylédones.

Les observations post-germinatives ont révélé que la pulvérisation des HEs induit des symptômes de stress oxydatif, tels que la chlorose, l'étiollement foliaire et le flétrissement, traduisant une altération de l'intégrité des membranes cellulaires, comme en témoigne l'augmentation de la fuite d'électrolytes et la peroxydation lipidique. De plus, une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier le H_2O_2 , a été constatée, accompagnée d'une réduction de la biosynthèse de la chlorophylle, d'une surproduction de proline et d'une perte hydrique significative. Ces perturbations biochimiques et physiologiques conduisent inévitablement à la mort des plantules. Ces constatations confirment le potentiel des HEs

comme bioherbicides et soulignent l'importance d'une évaluation détaillée de leur sélectivité et de leur impact environnemental avant toute application agronomique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Amri I., Hamrouni L., Gargouri S., Hanana M., Mahfoudhi M., Fezzani T., Ferjani E., Jamoussi B. (2011). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Pinus patula*. *Natural Product Communications*, 6, 1531-1536.
2. Amri I., Gargouri S., Hamrouni L., Hanana M., Fezzan, T. and Jamoussi, B. (2012). Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. *Journal of Pest Science*, 85, 199–207.
3. Amri I., Hamrouni L., Hanana M., Gargouri S., Fezzani T. and Jamoussi B. (2013). Chemical composition, physico-chemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils. *Biological Agriculture & Horticulture*, 29, 91-106.
4. Amri I., Hanana M., Jamoussi B. and Hamrouni L. (2017). Essential oil of *Pinus nigra* JF Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3877-S3882.
5. Amri I., Khammassi M., Gargouri S., Hanana M., Jamoussi B., Hamrouni L. and Mabrouk Y. (2022). Tunisian Pine Essential Oils: Chemical Composition, Herbicidal and Antifungal Properties. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(3), 430-443.
6. Amri I., Khammassi M., Ben Ayed R., Khedhri S., Ben Mansour M., Kochti O., Pieracci Y., Flamini G., Mabrouk Y., Gargouri S., Hanana M. and Hamrouni L. (2023). Essential oils and biological activities of *Eucalyptus falcata*, *E. sideroxylon* and *E. citriodora* Growing in Tunisia. *Plants*, 12(4), 816.
7. Benchaa S., Hazzit M. and Abdelkrim H. (2018). Allelopathic Effect of *Eucalyptus citriodora* Essential Oil and its Potential Use as Bioherbicide. *Chemistry & biodiversity*, 15(8), e1800202.
8. Benchaa S., Hazzit M., Zermane N. and Abdelkrim H. (2019). Chemical composition and herbicidal activity of essential oils from two *Labiata* species from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 31(4), 335-346.
9. Bainard L.D., Isman M.B. and Upadhyaya M.K. (2006). Phytotoxicity of clove oil and its primary constituent Eugenol and the role of leaf epicuticular wax in the susceptibility to these essential oils. *Weed Science*, 54 (5), 833-837.
10. Ben Kaab S., Rebey-BI., Hanafi M., Berhal C., Fauconnier M.L., De Clerck C., Ksouri R. and Jijakli H. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil as an effective antifungal and herbicidal agent. *Spanish journal of agricultural research*, 17 (2), e1006-e1006.

11. Barupal, T., Meena, M., & Sharma, K. (2019). Inhibitory effects of leaf extract of *Lawsonia inermis* on *Curvularia lunata* and characterization of novel inhibitory compounds by GC–MS analysis. *Biotechnology Reports*, 23, e00335.
12. Dankov K., Busheva M., Stefanov D. and Apostolova E.L. (2009). Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of the photosynthetic apparatus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 96, 49-56.
13. Fagodia S.K., Singh H.P.; Batish D.R. and Kohli R.K. (2017). Phytotoxicity and cytotoxicity of *Citrus aurantiifolia* essential oil and its major constituents: Limonene and citral. *Industrial Crops and Products*, 108, 708-715.
14. Grana E., Díaz-Tielas C., López-González D., Martínez-Peñalver A., Reigosa M.J., and Sánchez-Moreiras A.M. (2016). The plant secondary metabolite citral alters water status and prevents seed formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, 18, 423-432.
15. Hanana M., Bejia A., Amri I., Gargouri S., Jamoussi B. and Hamrouni L. (2014). Activités biologiques des huiles essentielles de pins. *Journal of New Sciences*, 4 (3), 18-32.
16. Ibáñez M.D. and Blázquez M.A. (2018). Phytotoxicity of essential oils on selected weeds: Potential hazard on food crops. *Plants*, 7, 79.
17. Kaur S., Singh H.P., Mittal S., Batish D.R. and Kohli R.K. (2010). Phytotoxic effects of volatile oil from *Artemisia scoparia* against weeds and its possible use as a bioherbicide. *Industrial Crops and Products*, 32, 54-61.
18. Khammassi M., Amri I., Souihi M., Mabrouk Y., Ferjani Dh., Hanana M. and Hamrouni L. (2023). Chemical composition and herbicidal potential of essential oil of *Eucalyptus maculata* Hook. *Scientific African*, 21, e01751.
19. Khedhri S., Khammassi M., Amri I., Mabrouk Y., Ferjani Dh., Gargouri S., Hanana M., Jamoussi B. and Hamrouni L. (2022). Phytochemical studies on essential oil of *Pinus pinaster* Aiton and evaluation of their biological activities. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 8 (2), 75-98.
20. Kouki H., Amri I., Souihi M., Pieracci Y., Trabelsi I., Hamrouni L., Flamini G., Hirsch A.M. and Mabrouk Y. (2023). Chemical composition, antioxidant, herbicidal and antifungal activities of leaf essential oils from three Tunisian *Eucalyptus* species. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1-12.
21. Kriegs B., Jansen M., Hahn K., Peisker H., Šamajová O., Beck M., Braun S., Ulbrich, A., Baluška F. and Schulz M. (2010). Cyclic monoterpene mediated modulations of *Arabidopsis thaliana* phenotype effects on the cytoskeleton and on the expression of selected genes. *Plant Signaling and Behavior*, 5, 832-838.

22. Liu M. & Lu S. (2016). Plastoquinone and ubiquinone in plants: biosynthesis, physiological function and metabolic engineering. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1898.
23. Marnett L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 424, 83-95.
24. Mahdavia F., Saharkhiz M.J. and Karami A. (2017) Defensive response of radish seedlings to the oxidative stress arising from phenolic compounds in the extract of peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Scientia Horticulturae*, 214, 133-140.
25. Movileanu, L., Neagoe, I., & Flonta, M.L. (2000). Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 205 (1-2), 135-146.
26. Mutlu S., Atici O., Esim N. and Mete E. (2011). Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in early seedlings of various weed species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 943-951.
27. Ootani M.A., dos Reis M. R., Cangussu A.S.R., Capone A., Fidelis R.R., Oliveira W., Barros H.B., Portella A.C.F., Aguiar R.de.S. and dos Santos W. F. (2017). Phytotoxic effects of essential oils in controlling weed species *Digitaria horizontalis* and *Cenchrus echinatus*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 12, 59-65.
28. Poonpaiboonpipat T., Pangnakorn U., Suvunnamek U., Teerarak M., Charoenying P. and Laosinwattana C. (2013). Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products*, 41, 403-407.
29. Scrivanti L.R., Zunino M.P. and Zygodlo J.A. (2003). *Tagetes minuta* and *Schinus molle* essential oils as allelopathic agents. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 563–572.
30. Schulz M., Kussmann P., Knop M., Kriegs B., Gresens F., Eichert T., Ulbrich A., Marx F., Fabricius H., Goldbach H. and Noga G. (2007). Allelopathic monoterpenes interfere with *Arabidopsis thaliana* cuticular waxes and enhance transpiration. *Plant Signaling and Behavior*, 2, 231-239.
31. Singh H.P., Batish D.R., Kaur S., Arora K. and Kohli R.K. (2006). α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*, 98, 1261-1269.
32. Singh H.P., Kaur S., Mittal S., Batish D.R. and Kohli R.K. (2009). Essential oil of *Artemisia scoparia* inhibit plant growth by generating reactive oxygen species and causing oxidative damage. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 154-162

33. Singh N., Singh H.P., Batish D.R., Kohli R.K. and Yadav S.S. (2020). Chemical characterization, phytotoxic, and cytotoxic activities of essential oil of *Mentha longifolia*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 13512-13523.
34. Smirnoff N. & Arnaud D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New phytologist*, 221 (3), 1197-1214.
35. Sunohara Y., Baba Y., Matsuyama S., Fujimura K. and Matsumoto H. (2015). Screening and identification of phytotoxic volatile compounds in medicinal plants and characterizations of a selected compound, eucarvone. *Protoplasma*, 252, 1047-1059.
36. Synowiec A., Kalembe D., Drozdek E. and Bocianowski J. (2017). Phytotoxic potential of essential oils from temperate climate plants against the germination of selected weeds and crops. *Journal of Pest Science*, 90, 407-419.
37. Verslues, P.E. & Sharma S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8, 23 p.
38. Vishwakarma G.S. & Mittal S. (2014). Bioherbicidal potential of essential oil from leaves of *Eucalyptus tereticornis* against *Echinochloa crus-galli* L. *Journal of Biopesticides*, 7, 47.
39. Weir T.L., Park S.-W. and Vivanco J.M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 472-479.
40. Yang GQ., Wan FH., Liu WX. and Guo J. (2008) Influence of two allelochemicals from *Ageratina adenophora* Sprengel on ABA, IAA and ZR contents in roots of upland rice seedlings. *Allelopathy Journal*, 21, 253-262.
41. Zhang J., An M., Wu H., Liu D.L. and Stanton R. (2014). Phytotoxic activity and chemical composition of aqueous volatile fractions from *Eucalyptus* species. *PLoS One* 9 (3): e93189.

Conclusion

Cette étude a pour objectif d'explorer le potentiel chimio-biologique de deux espèces forestières appartenant à la famille des Pinaceae, en examinant la variation des biomolécules actives présentes dans les huiles essentielles (HEs) extraites de divers organes végétaux. L'intérêt pour ces espèces a été motivé par le manque de données scientifiques concernant la variation de la composition chimique des HEs extraites de différentes parties et de leurs propriétés biologiques. L'analyse a porté sur l'identification et la quantification des composés volatils, ainsi que sur l'évaluation de leurs activités biologiques potentielles, afin de mettre en évidence l'intérêt économique et thérapeutique de ces ressources naturelles sous-exploitées. De ce fait, *Pinus nigra* Arn. Ssp. *mauretanica* (Mair. & Pey.) et *Abies numidica* De Lannoy ex Carrière ont été collectées et étudiées.

Les huiles essentielles issues de divers organes des plantes étudiées, ont été obtenues par hydrodistillation à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger. Les rendements ainsi que les caractéristiques physicochimiques des HEs extraites ont été évalués. La composition chimique de ces huiles a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS). En complément à l'extraction conventionnelle et aux analyses GC-MS, les composés volatils contenus dans les aiguilles et les branches de *P. nigra* ont été étudiés par une méthode innovante, la SPME (Solid Phase Microextraction) couplée à la GC-MS. Aussi, la composition chimique des HEs des cônes de *P. nigra* et des différentes parties (Aiguilles, branches et cônes) d'*A. numidica* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et muni de deux colonnes capillaires en gel de silice fondue: BP-1 (polydiméthylsiloxane) et BP-20 (polyéthylène glycol). De plus, les analyses ont été affinées par le recours à la RMN ^{13}C .

Dans cette partie, il ressort que les plantes étudiées ont de faibles rendements en HEs. Des rendements allant de 0,21% (cônes) à 0,47% (aiguilles) pour *P. nigra* et de 0,36% (aiguilles) à 0,45% (branches) pour *A. numidica*. Les propriétés physico-chimiques des HEs extraites ont été évaluées à l'aide de descripteurs normalisés tels que la densité relative, l'indice de réfraction, l'indice d'acidité et l'indice de peroxyde. Ces mesures sont cruciales pour évaluer la qualité et la sécurité lors du transport et du stockage des huiles essentielles, garantissant ainsi l'intégrité des transactions commerciales et la protection des consommateurs. Les valeurs enregistrées sont conformes aux normes de commercialisation des HEs, présentant des variations selon la partie de la plante utilisée. La densité relative varie entre 0,767 et 0,866 pour *P. nigra* et entre 0,837 et 0,857 pour *A. numidica*. Les indices de réfraction, très rapprochés, oscillent entre 1,653 (aiguilles *P. nigra*) et 1,665 (branches *A. numidica*). L'indice d'acide présente des valeurs

élevées pour tous les organes (de 2,3 à 17,7), suggérant la présence d'acides libres ou une hydrolyse des esters. Concernant l'indice de peroxyde, les cônes des deux espèces se distinguent par des valeurs élevées, atteignant environ 7,76 pour *P. nigra* et 8,71 pour *A. numidica*, comparativement aux autres parties des deux espèces.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique indiquent des différences qualitatives et quantitatives entre les HEs extraites : Un chémotype riche en sesquiterpènes hydrocarbonés (67,1 %) et, dans une moindre mesure, de leurs dérivés oxygénés (5,5 %) avec une prédominance de β -caryophyllène (26,2 %), le germacrène D (17,2 %), le phyllocladène (7,1 %), le δ -cadinène (6,9 %) et l' α -humulène (4,1 %) pour les HEs obtenues des aiguilles de *P. nigra*. En outre, les branches présentent un chémotype proche de celui identifié pour *P. nigra* de la province de Massa en Italie, riche en composés hydrocarbonés, répartis en mono- (63,3 %), sesqui- (6,1 %) et di- (16,5 %) terpènes. En revanche, les composés oxygénés sont nettement supérieurs à ceux des aiguilles et varient de 1,2 % (sesquiterpènes) à 7,2 % (monoterpènes). L' α -pinène (55,7 %), le phyllocladène (12,4 %), le cembrene (2,3 %) et le β -pinène (2,3 %) étaient les composés majoritaires pour cet organe. En ce qui concerne les cônes, l'analyse de la composition chimique a révélé qu'un chémotype dominé par l' α -pinène (58,1 %), le (E)- β -caryophyllène (4,2 %), le caryophyllène oxyde (3,3 %) et l'abiatatriène (2,3 %) constituait les composés majoritaires de cette partie de *P. nigra*. Contrairement à l'HD, la SPME a révélé beaucoup plus de composés volatils (hydrocarbonés mono et sesquiterpènes), un faible pourcentage de composés oxygénés (< 0,5 %), l'absence de composés volatils de poids moléculaire élevé (diterpènes) et une nouvelle classe de métabolites (acides gras) dépassant 40%.

Pour *A. numidica*, les analyses ont révélé des différences qualitatives et quantitatives dans les profils chimiques des HEs des trois organes étudiés. Les monoterpènes hydrocarbonés prédominent les trois parties de la plante, en particulier l' α -pinène (25,3 % pour les cônes, 59,7 % pour les branches et 17,6 % pour les aiguilles), son isomère le β -pinène (5,6 % pour les cônes, 12,9 % pour les branches et 6,8 % pour les aiguilles) et le limonène (40,7 % pour les cônes, 10 % pour les branches et 2,1 % pour les aiguilles).

Dans la seconde partie de cette étude, une évaluation des activités biologiques des huiles essentielles obtenues a été réalisée. Les activités antioxydantes des HEs des deux espèces ont été évaluées. Cinq méthodes, complémentaires, à savoir le pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium, l'activité antiradicalaire au DPPH, l'activité scavenger à l'égard de l'ABTS, le

test au phosphomolybdate et le test de blanchiment du β -carotène/acide linoléique. Les différents tests utilisés ont permis de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des huiles étudiées et les résultats enregistrés montrent une variation en fonction du chémotype et de la spécificité du test utilisé. Les HEs des deux espèces ont la capacité de neutraliser le radical DPPH $^{\bullet}$, et cette propriété présente des variations notables ($P < 0,05$) en fonction de l'organe et de l'espèce considérés. *A. numidica* présente les HEs ayant la meilleure activité scavenger du radical DPPH $^{\bullet}$, en particulier celles des cônes, comparativement à celles de *P. nigra*, pour l'ensemble des organes végétales. L'effet scavenger à l'égard de l'ABTS est observé à des concentrations plus élevées. La meilleure activité est enregistrée avec les huiles de *A. numidica* (les cônes; $IC_{50} 2.15 \pm 0.27$ mg/mL; les feuilles avec $IC_{50} = 33.56 \pm 0.46$ mg/mL). Ces valeurs restent toujours inférieures à celles obtenues pour l' α -tocophérol et à certaines autres molécules de référence, utilisées comme un témoin positif.

Les résultats du pouvoir réducteur enregistrés, pour toutes les HEs testées, semblent être meilleurs que ceux de la décoloration des cations radicaux dérivés de l'ABTS et de la décoloration des radicaux DPPH. Le test du phosphomolybdène a montré le meilleur pouvoir antioxydant et apparaît le plus adapté pour l'évaluation antioxydante des molécules lipophiles, comparé aux systèmes DPPH, ABTS, β -carotène et pouvoir réducteur. Une activité protectrice modérée envers le β -carotène a été enregistrée pour les différentes huiles testées.

Parallèlement à ce potentiel antioxydant, les HEs étudiées ont été testées pour leur efficacité anticholinestérasique. Les tests de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et du butyrylcholinestérase (BChE) in vitro ont montré que toutes les huiles testées

ont fortement inhibé l'enzyme AChE, avec des taux d'inhibition supérieurs à 50 % à 45 μ g/mL, signalons la plus forte inhibition des aiguilles de *P. nigra*, comparable à celle de la molécule de référence (tacrine). En ce qui concerne l'inhibition de la BChE, les HEs étaient moins efficaces que pour l'AChE et la tacrine, même à la concentration la plus élevée testée de 45 μ g/mL.

Enfin, des tests de biocontrôle sur certains organismes nuisibles à la santé de l'homme et de son environnement ont été effectués dans des conditions de laboratoires sur des souches bactériennes responsables de la pourriture des pommes de terre, sur des souches fongiques (*Alternaria* sp., *Fusarium* sp et *Botrytis cinerea*) isolées du blé et de la tomate, sur un insecte ravageur (*Callosobruchus maculatus*) des denrées stockées et sur deux adventices de culture (*Sinapis arvensis* et *Phalaris canariensis*). Pour les activités antibactériennes, les huiles testées

montrent une efficacité concentration-dépendante ainsi qu'une variation en fonction de l'organe végétal et de la souche testée. Les HEs issues des branches de *P. nigra* présentent l'activité la plus prononcée, à la plus forte concentration utilisée, notamment sur *Dickeya dadantii* avec une auréole d'inhibition de l'ordre de 13.77 mm. En contraste, les huiles des cônes d'*A. numidica*, à la plus forte concentration utilisée, semblent les plus actives sur les souches testées, enregistrant des zones d'inhibition dont les diamètres varient entre 11.46 mm (*Dickeya solani*) et 13.19 mm (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*). Signalons aussi la singularisation des huiles des branches en termes d'activité avec une zone d'inhibition de 15, 99 mm, à la plus forte concentration utilisée, sur la même souche.

Concernant les champignons phytopathogènes testés, les résultats expérimentaux montrent une activité antifongique significative ($P < 0,05$) des HEs extraites de deux espèces de Pinaceae. L'efficacité antifongique varie en fonction de l'espèce fongique cible et de l'organe végétal source des HEs. Les HEs d'*A. numidica* exhibent une capacité d'inhibition supérieure face à celles de *P. nigra*, avec une action inhibitrice particulièrement notable des HEs issues de aiguilles et de cônes contre *Botrytis cinerea* et *Mucor* sp., tandis que les HEs des branches sont plus actives contre *Alternaria* sp.

Pour ce qui est de l'activité insecticide, la toxicité des HEs a été évaluée par trois tests différents à savoir la toxicité par effet contact sur substrat alimentaire (grains de niébé), la toxicité par inhalation (fumigation) et la répulsion. Les résultats des différents tests révèlent que les HEs testées ont montré une activité insecticide variable en fonction de l'espèce, de l'organe étudié et de la dose d'huile appliquée sur les adultes de *C. maculatus*. De manière générale, l'analyse des marqueurs de toxicité de contact (DL_{50} et TL_{50}) montrent la forte toxicité adulticide des HEs d'*A. numidica* comparativement à celles de *P. nigra* où seuls les aiguilles ont provoqué des mortalités très élevées. Contrairement à l'effet contact, une toxicité modérée a été enregistrée pour l'ensemble des huiles testées, ce qui est probablement dû au faible temps de rémanence de ces essences riches en composés volatiles. Également, ces huiles sont modérément répulsives selon l'échelle de McDonald et ses collaborateurs.

L'étude a révélé que les HEs issues de deux espèces de Pinaceae possèdent des propriétés phytotoxiques manifestes, inhibant la germination et la croissance des adventices testées, tant au stade de pré-germination qu'au stade de plantule. Les HEs riches en monoterpènes oxygénés ont démontré une phytotoxicité supérieure, avec une sensibilité accrue observée chez les dicotylédones par rapport aux monocotylédones. L'activité herbicide des HEs est principalement due à l'induction d'un stress oxydatif, qui compromet l'intégrité des membranes cellulaires par la stimulation de espèces réactives de l'oxygène et la peroxydation lipidique des

acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires. De plus, une réponse adaptative au stress a été identifiée chez les adventices, caractérisée par une modulation des niveaux de proline en réaction à l'exposition aux HEs.

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse, ont permis de mettre en évidence les profils chimiques et les propriétés bioactives des huiles essentielles étudiées à l'égard de modèles biologiques expérimentaux. Ces huiles ont démontré des propriétés antioxydantes, anti-enzymatiques, insecticides, antimicrobiennes et herbicides, soulignant leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle polyvalents et éocompatibles. De façon générale, ces travaux participent également à une meilleure connaissance des composés chimiques contenus dans les huiles essentielles et de la biovalorisation de la flore aromatique algérienne, premier pas vers une meilleure préservation de la biodiversité végétale.

Afin de poursuivre cette étude, dans un premier temps, une caractérisation du mode d'action des composés à activité anti-enzymatiques, antifongiques et insecticides devra être envisagée. Dans un second temps, il faut étendre l'étude du potentiel biologique des molécules bioactives contenues dans ces huiles à d'autres modèles expérimentaux d'intérêt agro-écologique, *in situ* et *in vitro*.

Parallèlement à la recherche de composés volatils à activité biologique, un autre axe de recherche devra se développer sur la variation des composés non volatils de ces deux plantes. Cela nous permettra peut-être d'isoler des métabolites secondaires doués de propriétés biologiques.

Dans le cadre de la protection et de la conservation des ressources phytogénétiques, il est intéressant aussi, d'envisager une étude chimiotaxonomique pour ces deux espèces en rapport avec les facteurs pédoclimatiques afin de réussir leur introduction et leur multiplication dans des écotopes offrant les mêmes conditions de vie que ceux des habitats naturelles de ces espèces.

En fin, il serait intéressant d'envisager une étude des effets du changement climatique sur la production et l'accumulation des métabolites secondaires en particulier les HEs de ces deux essences forestières.

Annexes

Annexes

Annexe I: Activités insecticides des huiles essentielles de *P.nigra* et d' *A.numidica*

1. Test de toxicité par contacts sur substrat alimentaire (Aiguilles *P.nigra*)

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/ 4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24 h	2	1	1	2	3	2	2	3	3	3	2	3	4	3	4	4	42	42	13.12
48 h	2	2	2	3	3	4	3	4	5	4	5	4	4	4	6	6	61	103	32.18
72 h	2	3	2	2	4	4	5	4	5	4	4	3	6	6	4	3	61	164	51.25
96 h	3	3	4	5	4	5	3	5	5	4	5	4	6	6	6	5	73	237	74.06
Total (M/d/4j)	39				49				63				77						
M (%)	48.75				61.25				78.75				96.25						
Mc(%)	48.10				60.76				78.48				96.2						

Annexes

2. Test de toxicité par fumigation (inhalation) (Aiguilles *P. nigra*)

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/ 4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	1	0	2	1	1	2	2	3	2	1	1	1	1	2	22	22	6.87
48h	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	0	1	2	1	2	1	22	44	13.75
72h	2	2	3	3	1	2	3	1	1	3	2	1	2	2	2	2	32	76	23.75
96h	3	2	2	1	3	3	4	3	3	2	3	2	3	3	3	3	43	119	37.18
Total (M/d/4j)	29				30				29				31						
M (%)	36.25				37.5				36.25				38.75						
Mc (%)	35.44				36.71				35.44				37.97						

Total(M/d/4j): Nombre d'individus morts à la dose utilisée pendant 4 jours (96 heures);

M(%): Pourcentage de mortalité

Mc(%): Pourcentage de mortalité corrigée

Annexes

3. Test de Répulsion (Aiguilles *P.nigra*)

Doses/Répétitions		Huileessentielle	Acétone	PR (%)	RRm _D (%)	RRM (%)
D ₁	R ₁	4	6	20	15 ± 2.51	42 ± 1.72
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	5	5	00		
	R ₄	5	5	00		
D ₂	R ₁	2	6	50	42.5 ±1.7	
	R ₂	3	6	33,334		
	R ₃	1	5	66,667		
	R ₄	4	6	20		
D ₃	R ₁	3	7	40	45 ± 1.73	
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	2	8	60		
	R ₄	3	7	40		
D ₄	R ₁	0	10	100	67.5 ± 0.95	
	R ₂	4	6	20		
	R ₃	1	7	75		
	R ₄	1	7	75		

PR(%): Pourcentage de répulsion;

RR_{mD}(%): Pourcentage de répulsion moyen de la dose appliquée;

RRM(%): Pourcentage de répulsion moyen pour toutes les doses utilisées.

Annexes

4. Test de toxicité par contact (**Branches** *P. nigra*)

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/ 4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	0	1	2	2	23	23	7.18
48h	2	1	2	1	3	3	3	3	3	2	3	3	1	2	2	2	36	59	18.44
72h	3	2	2	2	4	4	4	3	2	3	2	2	3	3	2	4	45	104	32.5
96h	4	3	3	4	2	2	2	2	3	4	4	4	4	6	3	5	55	159	49.68
Total (M/d/4j)	36				43				40				42						
M(%)	45				53.75				50				52.5						
Mc (%)	44.03				53.16				49.36				51.89						

5. Test de toxicité par inhalation (**Branches** *P. nigra*)

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/ 4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	1	2	2	14	14	4.37
48h	1	1	2	2	0	0	2	1	2	1	2	2	1	0	1	1	19	33	10.31
72h	2	3	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	2	1	2	2	23	56	17.5
96h	2	2	3	2	1	2	1	2	3	2	2	3	2	3	2	3	35	91	28.44
Total (M/d/4j)	26				14				22				27						
M(%)	32.5				17.5				27.5				33.75						
Mc (%)	31.64				16.45				26.58				32.91						

Annexes

6. Test de Répulsion (**Branches** *P. nigra*)

Doses/Répétitions		Huileessentielle	Acétone	PR (%)	RRm _D (%)	RRM (%)
D ₁	R ₁	4	6	20	27.5 ± 1.5	49.37± 0.095
	R ₂	4	6	40		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	2	7	55,556		
D ₂	R ₁	2	8	60	40 ± 0.81	
	R ₂	4	6	20		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	3	7	40		
D ₃	R ₁	0	10	100	60 ± 0.5	
	R ₂	2	8	60		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	3	7	40		
D ₄	R ₁	1	9	80	70 ± 0.81	
	R ₂	1	9	80		
	R ₃	1	9	80		
	R ₄	3	7	40		

Annexes

7. Test de toxicité par contact sur substrat alimentaire Adultes de *Callosobruchus maculatus* (Cônes *P. nigra*).

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/ 4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	1	0	2	1	2	1	2	3	2	2	2	2	3	3	28	28	8.75
48h	1	1	1	2	2	2	1	2	3	2	2	2	3	3	4	4	33	61	19.06
72h	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	3	3	4	3	3	4	43	104	32.5
96h	3	3	3	4	3	3	2	3	4	3	4	4	3	4	4	5	55	159	49.68
Total (M/d/4j)	29				34				44				59						
M(%)	36.25				42.5				55				73.75						
Mc (%)	35.44				41.77				54.43				73.42						

8. Test de toxicité par inhalation (Cônes *P. nigra*).

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	1	0	2	1	1	2	2	3	2	1	1	2	1	2	23	23	7.18
48h	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	0	1	2	1	2	3	26	49	15.31
72h	2	3	3	3	1	2	2	1	1	3	2	1	2	2	2	2	32	81	25.31
96h	3	2	2	1	3	3	4	3	3	2	2	2	3	3	3	3	42	113	35.31
Total (M/d/4j)	30				31				28				34						
M(%)	37.5				38.75				35				42.5						
Mc (%)	36.71				37.97				34.17				41.77						

Annexes

9. Répulsion(Cônes*P.nigra*).

Doses/Répétitions		Huileessentielle	Acétone	PR (%)	RRm _D (%)	RRM (%)
D ₁	R ₁	4	6	20	40 ± 1.15	56.25± 0.15
	R ₂	4	6	20		
	R ₃	2	8	60		
	R ₄	2	8	60		
D ₂	R ₁	2	8	60	55 ± 0.95	
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	1	9	80		
D ₃	R ₁	0	10	100	65 ± 1.25	
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	2	8	60		
	R ₄	2	8	60		
D ₄	R ₁	3	7	40	65 ± 0.95	
	R ₂	2	8	60		
	R ₃	1	9	80		
	R ₄	1	9	80		

Annexes

10. Test de toxicité par contact sur substrat alimentaire Adultes de *Callosobruchus maculatus* (Aiguilles *A. numidica*).

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	0	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	3	3	28	28	8.75
48h	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	3	3	3	38	66	20.62
72h	2	3	2	2	3	3	3	4	3	4	3	4	3	3	3	2	47	113	35.31
96h	3	3	4	3	4	4	3	4	4	4	4	4	3	3	4	5	59	172	53.75
Total (M/d/4j)	33				45				47				47						
M(%)	41.25%				56.25%				58.75				58.75						
MC (%)	40.50				55.69				58.23				58.23						

11. Test de toxicité par inhalation (Aiguilles *A. numidica*).

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/ 4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₁			
24h	1	1	1	0	2	1	1	2	2	3	2	1	1	2	2	2	24	24	7.5
48h	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	2	3	26	50	15.62
72h	2	3	2	3	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	30	80	25
96h	3	2	2	2	3	3	4	3	3	2	3	2	3	3	3	3	44	124	38.75
Total (M/d/4j)	30				29				29				36						
M(%)	37.5				36.25				36.25				45						
MC (%)	36.71				35.44				35.44				43.04						

Annexes

12. Répulsion(Aiguilles *A.numidica*).

Doses/Répétitions		Huileessentielle	Acétone	PR (%)	RRm _D (%)	RRM (%)
D ₁	R ₁	0	10	100	45 ± 2.63	51.25± 1.78
	R ₂	5	5	0		
	R ₃	5	5	0		
	R ₄	1	9	80		
D ₂	R ₁	4	6	20	50 ± 1.73	
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	0	10	100		
	R ₄	3	7	40		
D ₃	R ₁	3	7	40	55 ± 1.3	
	R ₂	2	8	60		
	R ₃	4	6	40		
	R ₄	1	9	80		
D ₄	R ₁	2	8	60	55 ± 2.06	
	R ₂	5	5	00		
	R ₃	2	8	60		
	R ₄	0	10	100		

Annexes

13. Test de toxicité par contact sur substrat alimentaire Adultes de *Callosobruchus maculatus* (Branches *A. numidica*).

Dose Temps	D ₁				D				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	26	26	8.215
48h	2	1	2	1	3	3	3	3	3	2	3	3	1	2	2	2	36	62	19.375
72h	3	2	2	2	3	4	3	3	3	3	2	3	3	4	4	4	48	110	34.375
96h	4	3	3	4	2	3	3	3	3	4	4	4	4	6	4	5	59	169	52.8125
Total (M/d/4j)	34				43				44				48						
M(%)	42.5				53.75				55				60						
Mc (%)	41.77				53.16				54.43				59.5						

14. Test de toxicité par inhalation (*Branches A. numidica*).

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/4j)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	2	1	2	1	1	0	1	2	1	1	2	1	2	2	21	21	6.56
48h	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	2	3	2	2	2	26	47	14.68
72h	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	3	1	3	3	2	3	37	84	26.25
96h	2	2	3	2	3	3	3	2	3	2	2	3	4	5	5	3	47	131	40.94
Total (M/d/4j)	26				30				31				44						
M(%)	32.5				37.5				38.75				55						
Mc (%)	31.64				36.71				37.97				54.43						

Annexes

15. Répulsion(BranchesA. numidica).

Doses/Répétitions		Huileessentielle	Acétone	PR (%)	RRm _D (%)	RRM (%)
D ₁	R ₁	4	6	20	40 ± 0.81	58.75± 0.99
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	2	8	60		
D ₂	R ₁	2	8	60	55 ± 0.95	
	R ₂	1	9	80		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	3	7	40		
D ₃	R ₁	1	9	80	65 ± 0.95	
	R ₂	1	9	80		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	2	8	60		
D ₄	R ₁	1	9	80	75 ± 0.5	
	R ₂	1	9	80		
	R ₃	1	9	80		
	R ₄	2	8	60		

Annexes

16. Test de toxicité par contact sur substrat alimentaire Adultes de *Callosobruchus maculatus* (Cônes *A. numidica*).

Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	2	1	2	0	3	2	2	3	2	3	2	3	2	2	2	2	33	33	10.31
48h	2	2	1	2	2	3	2	3	2	2	3	3	2	3	4	3	39	72	22.5
72h	2	3	2	2	2	3	3	4	4	3	4	3	4	4	3	2	48	120	37.5
96h	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4	3	3	58	178	55.62
Total (M/d/4j)	35				47				49				47						
M(%)	43.75				58.75				61.25				58.75						
Mc (%)	43.03				58.23				60.76				58.23						

17. Test de toxicité par inhalation (Cônes *A. numidica*).

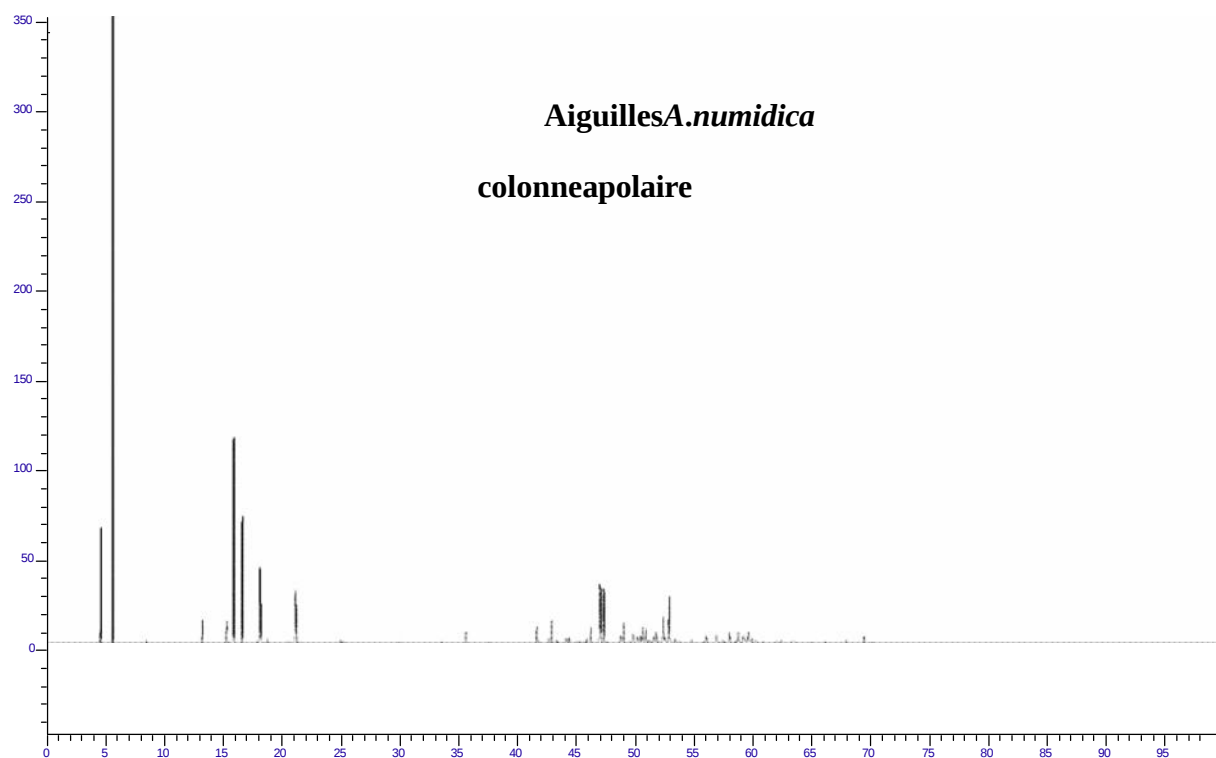
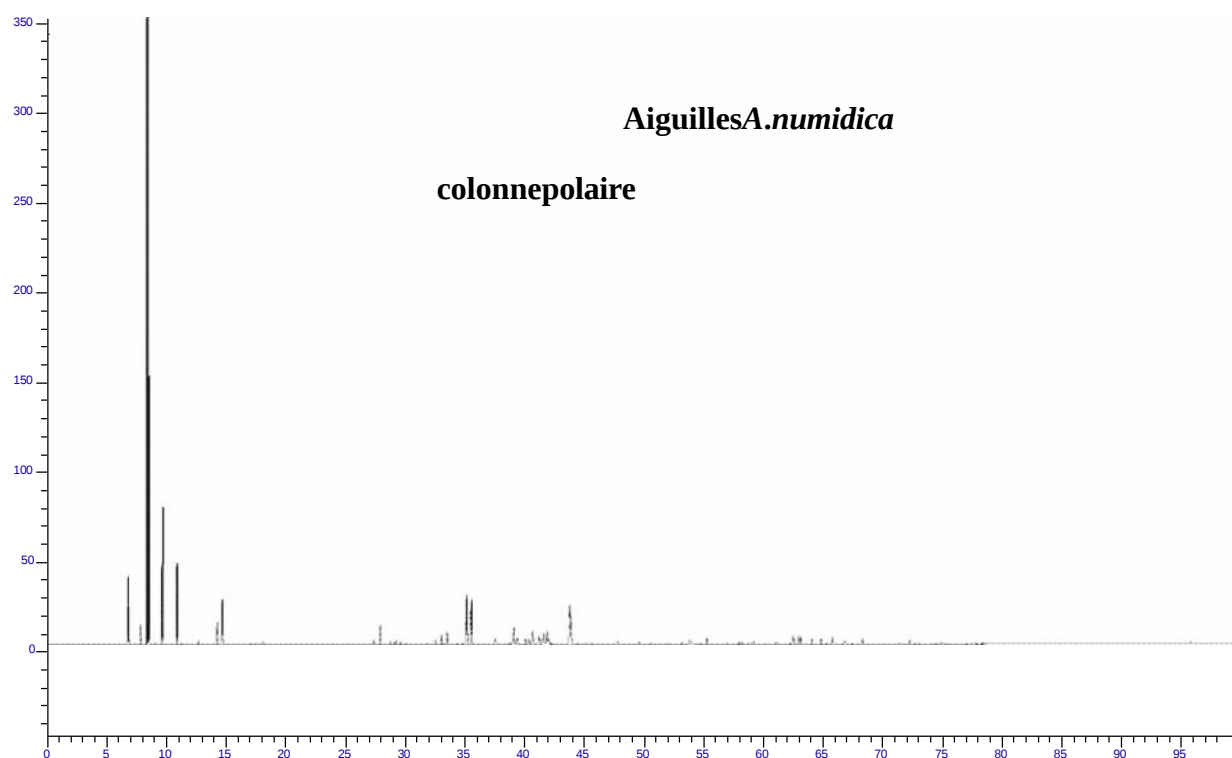
Dose Temps	D ₁				D ₂				D ₃				D ₄				Mortalité (pour toutes les doses/4j)	Mortalité cumulée (pour toutes les doses)	Mortalité cumulée (%) (pour toutes les doses)
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄			
24h	1	1	1	0	2	1	1	2	2	3	2	1	1	2	1	2	23	23	7.18
48h	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	0	1	2	2	2	3	27	50	15.62
72h	2	3	3	3	1	3	3	2	2	3	3	3	3	2	3	3	42	92	28.75
96h	3	2	2	3	3	3	4	3	3	2	4	4	4	4	5	3	52	132	41.25
Total (M/d/4j)	31				34				36				42						
M(%)	38.75				42.5				45				52.5						
Mc (%)	37.97				41.77				44.31				51.90						

Annexes

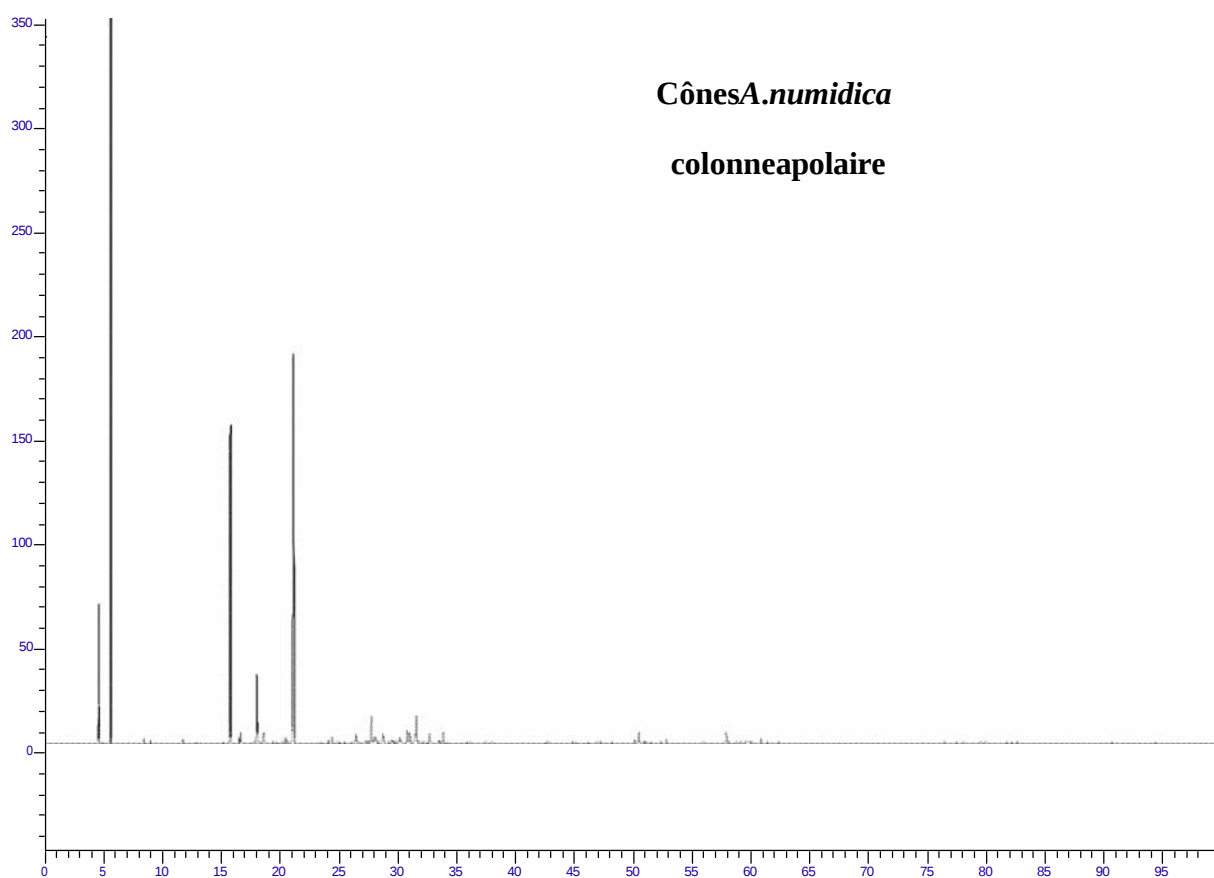
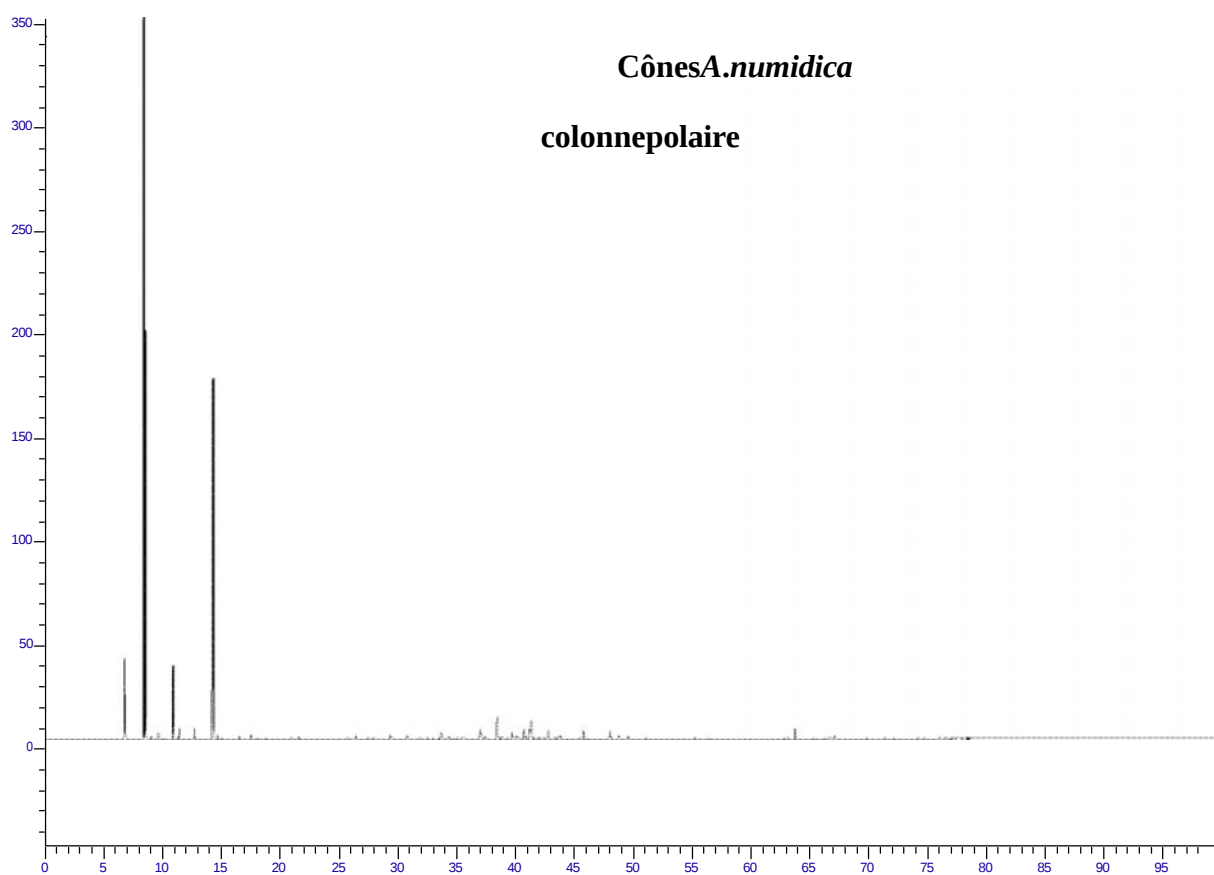
18. .Répulsion(Cônes*A.numidica*).

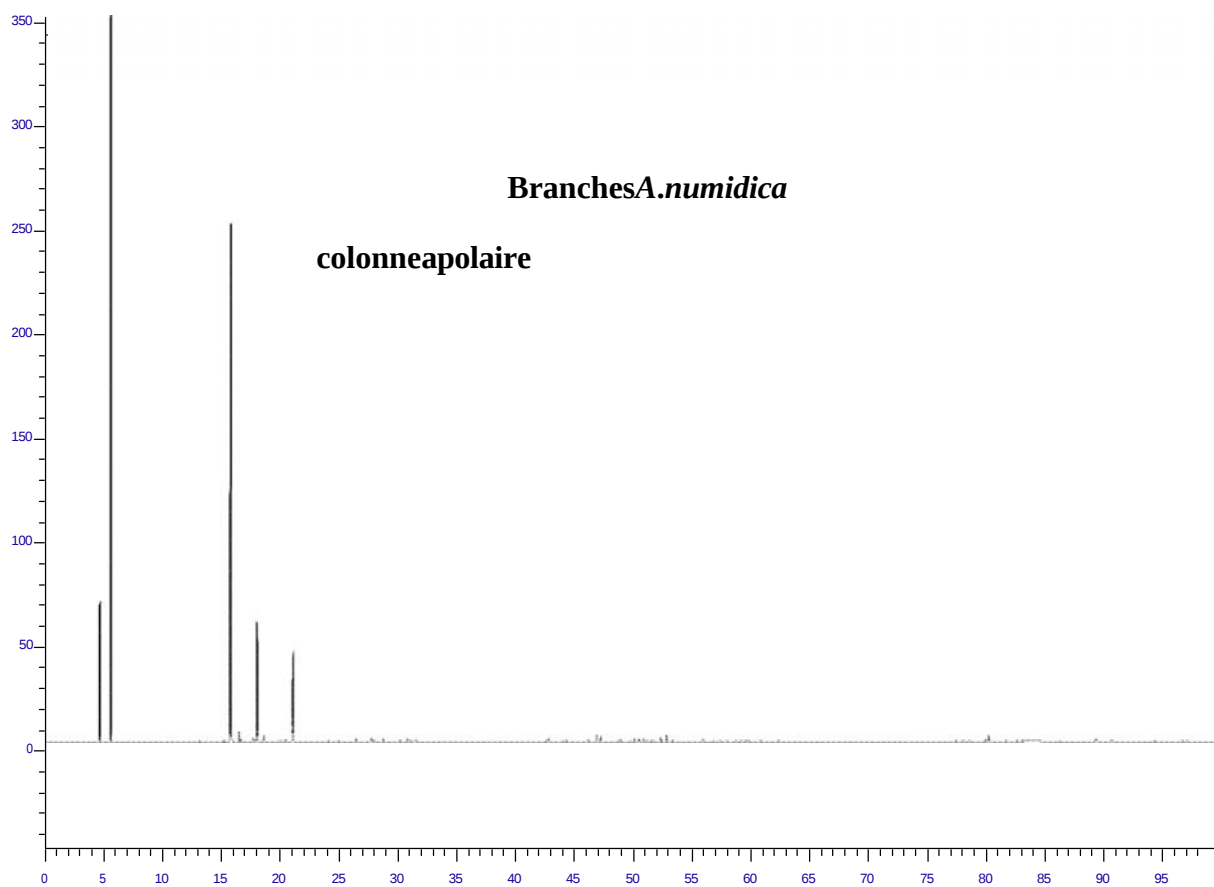
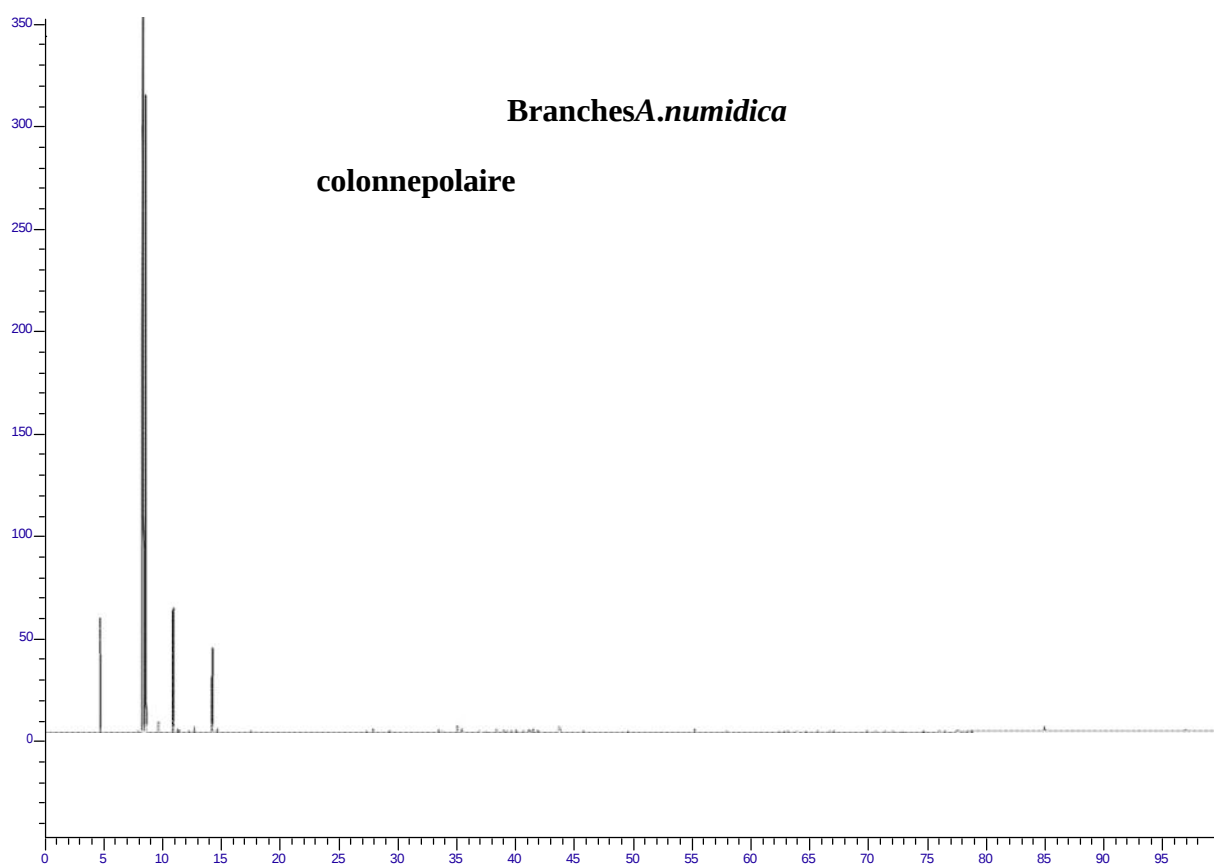
Doses/Répétitions		Huileessentielle	Acétone	PR (%)	RRm _D (%)	RRM (%)
D ₁	R ₁	3	7	40	40 ± 0.5	60±1.02
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	2	8	60		
	R ₄	3	7	40		
D ₂	R ₁	2	8	60	55 ± 0.95	
	R ₂	3	7	40		
	R ₃	3	7	40		
	R ₄	1	9	80		
D ₃	R ₁	3	7	40	65 ± 0.95	
	R ₂	2	8	60		
	R ₃	1	9	80		
	R ₄	1	9	80		
D ₄	R ₁	0	10	100	80 ± 0.5	
	R ₂	1	9	80		
	R ₃	1	9	80		
	R ₄	1	9	80		

Annexe II. Chromatogrammes des HES d'*A.numidica* et des cônes de *P.nigra*

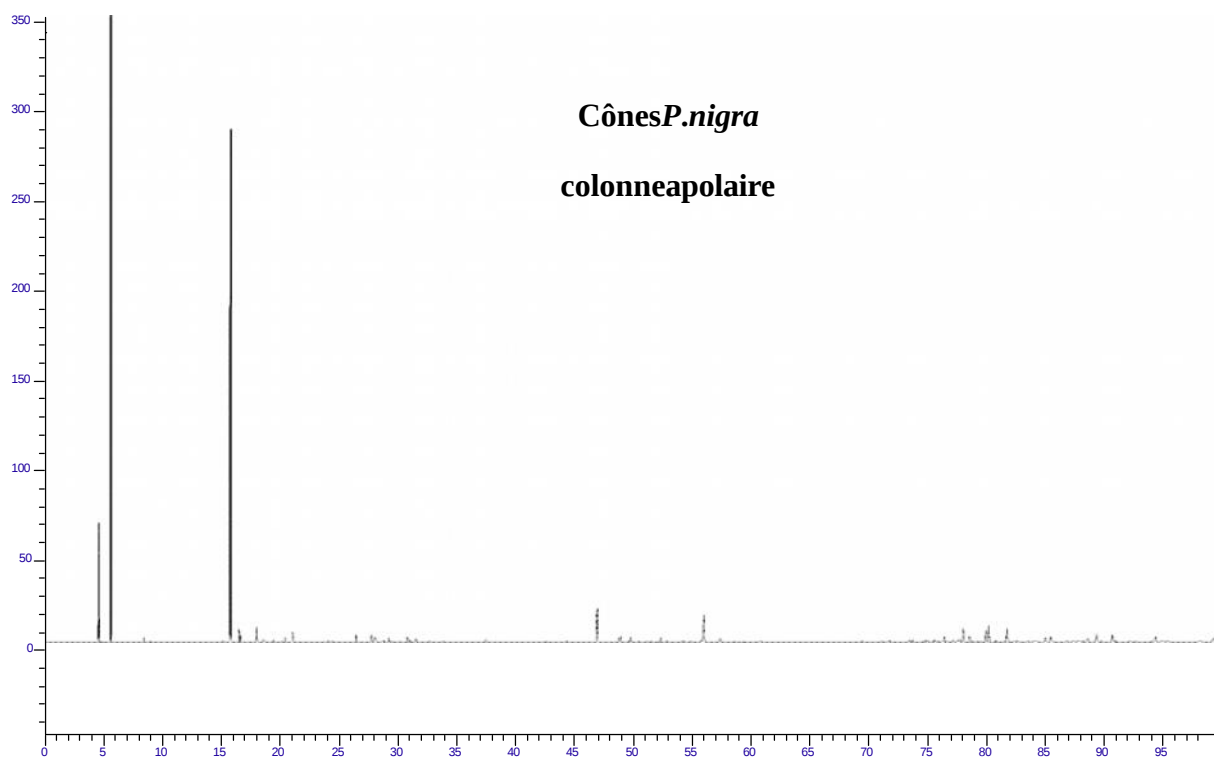
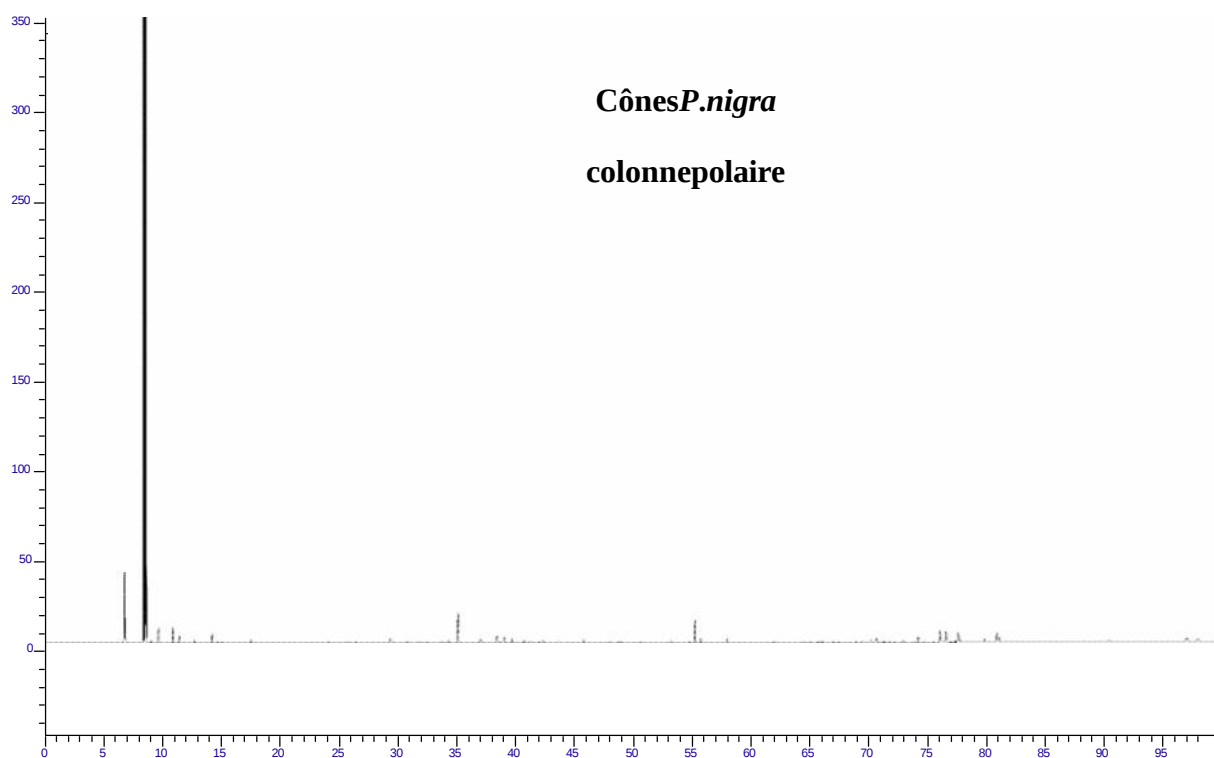


Annexes





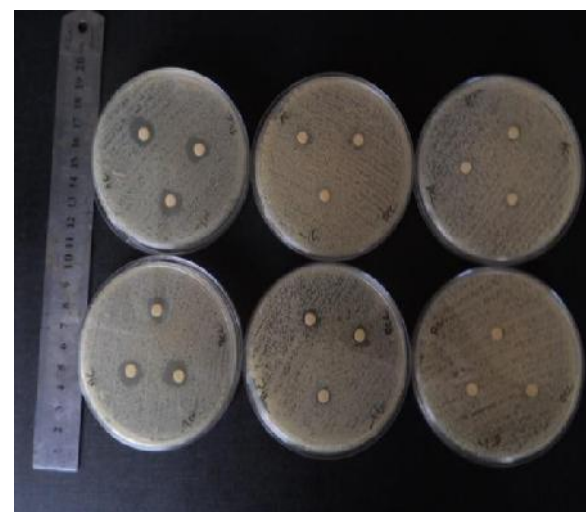
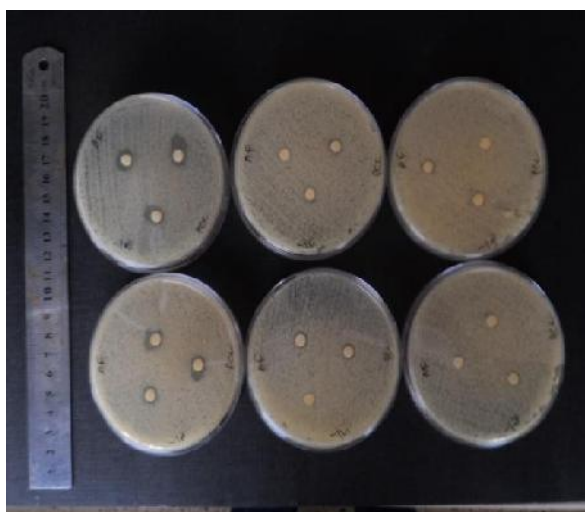
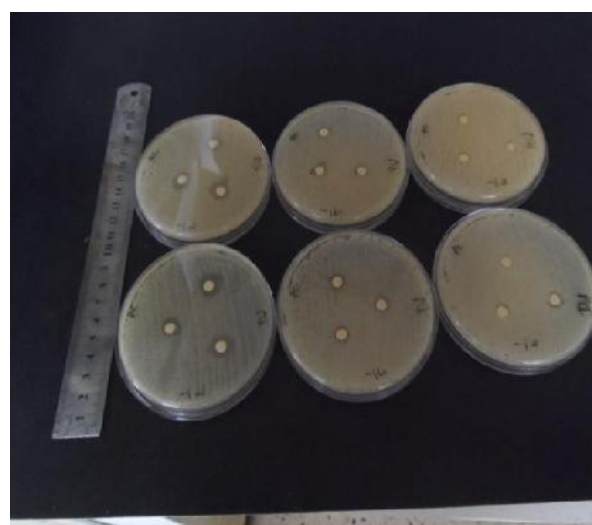
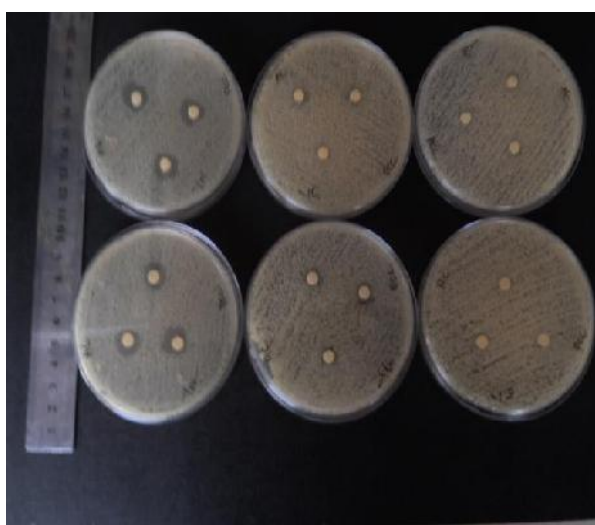
Annexes



Annexe III. Quelques photographies de l'activité antibactérienne



Annexes





Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology

Official Journal of the Societa Botanica Italiana

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tplb20>

Chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of a new essential oil chemotype of *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* (Pinaceae), Northern Algeria

A. Adjaoud, H. Laouer, A. Braca, P. Cioni, K. Moussi, M. Berboucha-Rahmani, H. Abbaci & D. Falconieri

To cite this article: A. Adjaoud, H. Laouer, A. Braca, P. Cioni, K. Moussi, M. Berboucha-Rahmani, H. Abbaci & D. Falconieri (2022) Chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of a new essential oil chemotype of *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* (Pinaceae), Northern Algeria, Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 156:2, 358-369, DOI: [10.1080/11263504.2020.1857871](https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1857871)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1857871>



Published online: 21 Dec 2020.



Submit your article to this journal



Article views: 160



View related articles



View Crossmark data



Citing articles: 1 View citing articles





Chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of a new essential oil chemotype of *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* (Pinaceae), Northern Algeria

A. Adjaoud^a, H. Laouer^b, A. Braca^c , P. Cioni^c, K. Moussi^a, M. Berboucha-Rahmani^d, H. Abbaci^e and D. Falconieri^f

^aLaboratoire de Biomathématiques, Biophysique, Biochimie et Scientométrie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algérie; ^bLaboratory of Natural Resources Valorization, Department of Biology and Plant Ecology, Ferhat Abbas University, Setif-1, Algeria; ^cDipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Pisa, Pisa, Italy; ^dLaboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algérie; ^eLaboratoire de Maîtrises des Energies Renouvelables, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algérie; ^fITI "M. Giua", Cagliari, Italy

ABSTRACT

Essential oil (EO) of aerial parts (twigs and needles) of an Algerian-Moroccan endemic pine *Pinus nigra* Arn. ssp. *mauretanica* (Mair. & Pey.) (Pinaceae) collected in Northern Algeria were extracted by hydrodistillation (HD) and solid phase micro-extraction (SPME). The compounds were analysed using Gas Chromatography (GC) and GC-Mass Spectrometry (GC-MS). The mean oil yield was 0.23%, for twigs and 0.47% for needles. 83 and 91 compounds have been identified for needles and twigs respectively. Chemical divergences from all other studied Black pines worldwide were observed in needles where the major components identified by HD are β -caryophyllene (26.2%), germacrene D (17.2%), α -pinene (9.4%) unveiling a new chemotype. Significant qualitative and quantitative differences were observed in chemical composition, depending on both techniques HD and SPME. Twigs showed a higher potential for the antioxidant activities DPPH, ABTS and β -carotene system than EO needles. In other hand, needles revealed a higher activity for all concentrations than twigs with significant differences ($p < 0.05$). For phosphomolybden tests, both EOs exhibited more significant antioxidant potential compared to the DPPH, ABTS, β -carotene and reducing power systems. Noticeable insecticidal effects with variable rate depending on used plant parts, concentration, duration and frequency of exposure were also observed.

ARTICLE HISTORY

Received 6 July 2020
Accepted 26 November 2020

KEYWORDS

Pinus nigra ssp. *mauretanica*; chemotype; essential oils; hydrodistillation; SPME; antioxidant-insecticidal activities; Algeria

Background

So far, to our knowledge no study has targeted chemical composition analysis and biological activities of the Algerian black pine EOs that may differ depending on the area where this tree is grown. *P. nigra* ssp. *mauretanica* is a valuable Algerian-Moroccan narrow-endemic species classified as endangered according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN). Human perturbation that promoted habitat deterioration led this tree to becoming almost extinct in the country. Biodiversity conservation can be accomplished and encouraged in a number of ways. Acquiring scientific knowledge on the species is not only important for designing conservation strategies (restoration of habitats) but also for the sustainable use of its non-wood products including EOs, which may exhibit different biological activities.

Introduction

Pines are considered as one of the major components of many temperate forests (Farjon 2018) with more than 100

species mainly distributed over the Northern hemisphere (Keeley 2012; Farjon 2018; Kurti et al. 2019; Silori et al. 2019). *Pinus nigra* Arn. (Pinaceae), is a tree widely distributed in the Balkans and Asia Minor (Enescu et al. 2016). Largest extents are found in Turkey covering 27% of forested land, of which 51% are productive forests (Atalay and Efe 2012). Reduced and discontinuous areas are more noticeable in south Mediterranean countries such as Morocco and Algeria. The fragmented distribution of the species has led to morphological variations (Rubio-Moraga et al. 2012). The resulting patches became genetically isolated after migratory movements during interglacial warm periods (Afzal-Rafii and Dood, 2007). In Algeria, the unique natural population of the investigated subspecies *Pinus nigra* Arn. ssp. *mauretanica* (Mair. & Pey.) is restricted to a small patch within the nature reserve of national park of Djurdjura. According to Qu'ézel and Médail (2003), the species *Pinus nigra* Arn. is divided into six subspecies: *P. nigra* ssp. *dalmatica* (Vis.), *P. nigra* ssp. *laricio* (Poir.), *P. nigra* ssp. *mauretanica* (Mair. & Pey.), *P. nigra* ssp. *nigra* (Arn.), *P. nigra* ssp. *pallasiana* (Lamb.) and *P. nigra* ssp. *salzmannii* (Dun.). Pines are represented in Algeria by some introduced species such as *P. brutia* (Ten.), *P.*

canariensis (C. Sm. ex DC.), *P. coulteri* (D. Don.), *P. jeffreyi* (Balf.), *P. massoniana* (D. Don.), *P. montezumae* (Limb.), *P. patula* (Schiede ex Schltdl. et Cham.), *P. pinaster* (Aiton.), *P. pinea* (L.), *P. ponderosa* (C. Lawson), *P. radiata* (D. Don.), *P. roxburghii* (Sarg.) and *P. sylvestris* (L.) (Treep 1976). Few native pines are represented in the country by *P. pinaster* (Aiton.), *P. halepensis* (Mill.) and *P. clusiana* (Clem.) (*P. nigra* ssp. *mauretanica* (Mair. & Pey.) (Quezel and Santa 1962). It is worth mentioning that the intraspecific taxonomy, classification and chorology of this species are still unclear (Liber et al. 2003). Among all growing pines in the country, Aleppo pine is the most widespread species occupying more than 35% of the forest area. Biological activities of its EO have been thoroughly investigated (Abi-Ayad et al. 2011; Fekih et al. 2014; Sadou et al. 2015; Djerrad et al. 2017; Ramdani et al. 2020). Aleppo pine resin is commonly used as a traditional medicine for treating asthma (Meddour and Meddour-Sahar 2015) and some kidney diseases (Berroukche et al. 2014). Indeed, EOs from various coniferous plants, rich in terpenes such as α -pinene, β -pinene, β -myrcene, limonene, camphene, are known to produce different volatile compounds used in medicine, cosmetics and food industry. Although several studies dealing with the composition of the EOs of various *Pinus* species have been published during the past 20 years (Dobetal. (2005, 2007); Ait Mimoune et al. 2013; Fekih et al. 2016; Merah et al. 2018; Fekih et al. 2019), no data are available on EOs of the Black pine growing natively in Algeria. EOs variation and composition obtained from hydrodistilled needles and twigs, were revealed in this study by using GC-EIMS. In addition, the evaluation of the antioxidant activity was carried out by more than one test method (DPPH, ABTS, β -carotene, reducing power and phosphomolybdenum assays). The intention of this study was also to evaluate different insecticidal activities of these EOs against adults of Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera, Bruchidae). It is worth mentioning that for Black pine, even in European countries less numerous studies have been published on research questions different than ecological or genetic aspects. Indeed, relatively few studies were focused on the chemical composition of EOs of *Pinus nigra* (Tobolski and Zinkel 1982; Lange and Spanoudaki 1995; Ochocka et al. 2002; Rezzi et al. (2002, 2005; Macchioni et al. 2003; Mumm et al. 2004; Duquesnoy et al. 2007); Duquesnoy et al. 2007) and less on antimicrobial properties (Politeo et al. 2011a; Sarac et al. 2014; Mitić et al. 2018; Kurti et al. 2019) or antioxidant activities (Politeo et al. 2011b; Ustun et al. 2012; Sarac et al. 2014; Kurti et al. 2019). To the best of our knowledge, this is the first study in Algeria aimed to determine the chemical composition of the EOs, antioxidant and insecticidal activities from the aerial parts of *P. nigra* ssp. *mauretanica*.

Materials and methods

Plant material and essential oil extraction

In June 2009, aerial parts of *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* were harvested in the unique natural population located in the National Park of Djurdjura at an elevation of 1521 m (36°27'09"N, 004°06'26"E), northern Algeria. Only fresh needles

and twigs were collected during flowering stage at mid-day sun then dried under shade in the open air for 15 days (until constant weight). 150 g of each sample are introduced into a 6 L flask filled with distilled water and hydrodistilled using a Clevenger-type apparatus brought to the boil for 3 hours. EO is subsequently separated from the aqueous phase by adding anhydrous sodium sulfate. The EO was kept in sealed dark vials refrigerated at 4°C until further analysis. EO yields were estimated on a dry weight (w/w). The voucher specimen has been deposited at the laboratory of valorization of natural biological resources, university of Setif I, Algeria.

Analysis of essential oil

HS-SPME analysis

Volatiles emitted were sampled by means of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) using SPME fiber (Supelco) coated with polydimethylsiloxane (PDMS, 100 μ m). After an equilibration time (20 min), the fiber was exposed to the headspace for 5 sec (saturation time) at 75°C using ca. 5 g plant matrix in 50 mL conical flask. Once sampling was finished, the fiber was withdrawn from the needle and transferred to the injection port of the Gas Chromatography-Electron Impact Mass Spectrometry (GC-EIMS) system.

GC-EIMS analysis

The GC-EIMS analyses were performed with a Varian CP-3800 gas chromatograph equipped with a DB-5 capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m coating thickness) and a Varian Saturn 2000 ion trap mass detector. GC-EIMS analyses were performed under the following conditions for all standards: injector temperature 220°C; transfer line 240°C; oven temperature range 60–240 (3°C/min); carrier gas helium at 1 mL/min; injection of 0.2 μ L (10% n-hexane solution) and split ratio 1:30; mass spectra in the 35–400 m/z range (1 scan/s). The identification of the chemical compounds was based on comparison of the retention time values with those of authentic standards, or by comparing their linear retention indices relative to the homologous series of n-alkanes; chemical compounds gathered by Adams (Adams 1995); MS libraries data (NIST 98); in-house library mass spectra built up from pure substances Swigar and Silverstein 1981 or reported data in the literature (Stenhagen et al. 1974; Jennings and Shibamoto 1980; Davies 1990; Adams 1995).

Antioxidant activities

DPPH⁺ activity

This assay detects scavenging activity of the stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical in the presence of hydrogen donating antioxidant oils samples. Briefly, 20 μ L of each EO dilutions (1–100 mg/mL) or standards (α -tocopherol and pure compounds of EO used as positive controls) were added to 180 μ L of ethanolic solution of 100 μ M DPPH in a 96-well microplate. The mixture was incubated at 37°C for 30 min and the absorbance was measured at 515 nm against ethanol blank (Rangkadilok et al. 2007). The

percentage inhibition ability of free radical DPPH was calculated from $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$ where A_{control} is the absorbance of the control reaction (containing DPPH solution and ethanol) and A_{sample} is the absorbance in the presence of plant extract (EOs and standards). The results were expressed by IC_{50} , which represents the concentration required to scavenge 50% of DPPH $^{\bullet}$, calculated from graph plotting inhibition percentage against EO concentrations.

ABTS $^{+}$ activity

The ABTS cation radical (bluish-green color) is formed by the loss of an electron by the nitrogen atom. In the presence of antioxidant, the nitrogen atom quenches the hydrogen atom and hence decolorizes the solution (Pisoschi and Negulescu 2011). The ABTS $^{+}$ was generated by reacting at room temperature for 16 hours in the dark, 7 mM of ABTS salt with 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) (Katalinic et al. 2006). Radical cation was diluted with ethanol up to absorbance value of 0.750 ± 0.025 at 734 nm. To 20 mL of various concentrations (1–100 mg/mL) of EOs and standards, 180 mL of ABTS $^{+}$ solution was added. The absorbance was measured 6 min after incubation in the dark at room temperature against ethanol blank. The control containing ABTS $^{+}$ solution and ethanol was prepared in the same conditions. The scavenging effect was calculated by the following equation:

% inhibition = $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$ where A_{control} is the absorbance of the control and A_{sample} is the absorbance of the EOs or standards. The results expressed by IC_{50} , which represents the concentration required to scavenge 50% of ABTS $^{+}$, calculated with the same as described in DPPH radical assay.

b-Carotene bleaching activity

This assay is based on an oxidation of b-carotene with free radicals, mainly conjugated diene from hydroperoxides arising from linoleic acid oxidation (Ghazian et al. 2016). The emulsion was prepared by mixing 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 20 in 3 mL of b-carotene solution (5 mg/50 mL chloroform). The chloroform was completely evaporated and 100 mL of oxygenated distilled water was added to the dry mixture and agitated vigorously. To 100 mL of EO or α -tocopherol (1–5 mg/mL) were added 3 mL of the obtained fresh emulsion. The absorbance at 470 and 700 nm was taken immediately and after 60 min of incubation at 50°C (Lim and Quah 2007). The control (containing all reagents without tested sample) was prepared in the same conditions. The degradation rate of b-carotene (DR) was calculated by the following formula: $DR = A_{0\text{min}} - A_{60\text{min}}$ where $A_{0\text{min}}$ is the initial absorbance at time 0 and $A_{60\text{min}}$ is the absorbance at 60 minutes. The antioxidant activity (% AA) was calculated by the following formula: $AA\% = (DR_{\text{control}} - DR_{\text{sample}} / DR_{\text{control}}) \times 100$. The results expressed by IC_{50} , which represents the concentration required to obtain 50% of degradation rate of b-carotene.

Reducing power

The antioxidant reacts with the potassium ferricyanide to form potassium ferrocyanide which then reacts with ferric trichloride to give a blue colored complex with a maximum absorbance at 700 nm (Pisoschi and Negulescu 2011). 1 mL of EO or α -tocopherol was mixed with sodium phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of 1% solution of $K_3Fe(CN)_6$. After incubation at 50°C for 20 min, 2.5 mL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture and centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min. 2.5 mL of supernatants were mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of 0.1% $FeCl_3$. The absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance of the mixture indicated increased reducing power (Liu and Yao 2007).

Total antioxidant activity (TAT)

The evaluation of total antioxidant activity of EOs was evaluated by phosphomolybdenum method which is based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) (Prieto et al. 1999). 400 μ L of EOs was added to 4 mL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The reaction mixture was incubated at 95°C for 90 min. The absorbance of the solution was measured at 695 nm against blank (400 μ L of the ethanol and 4 mL of reagent solution). The antioxidant capacity was expressed as equivalent of ascorbic acid (mg AAE g^{-1} of EO).

Insecticidal activity

Rearing conditions

Callosobruchus maculatus (F.) was collected from a cultivated cowpea variety (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in Bejaia, Algeria. The cowpea beetles were reared in the laboratory on cleaned cowpea seeds in a climatic chamber set at $30 \pm 1^\circ\text{C}$, photoperiod of 12 h and relative humidity of 75%. Bioassays were carried out on unsexed adults. The effectiveness in insecticidal of *P. nigra* EOs on the grain pests was studied using contact, fumigation and repulsivity tests.

Contact toxicity

This bioassay was conducted following the method described by Tapondjou et al. (2003) using groups of twenty adult insects to evaluate the mortality effect. An appropriate quantity of EO was diluted in acetone to obtain each test solution. A 1 mL aliquot of test solution containing 2, 4, 8, 16 and 0 (control) μ L/mL was poured onto a Petri dish (9 cm diameter) containing 40 g of sterilized cowpea seeds. The treated Petri dishes were kept in an incubator at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and 75% r.h. Mortality rate was checked daily during 4 days. Four replicates were set up for each EO concentration and control. The insecticidal activity of the oil was expressed as % mean mortality.

Fumigation bioassay

In order to test the toxicity of EOs on the adult of *C. maculatus* (F.), 20 adults were put into the 500 mL glass

jars. EOs were applied to a bit of cotton that was attached to the lower side of the jar's lid (Toudert-Taleb et al. 2014). The doses of EOs used were 2, 4, 8, 16 and 0 (control) mL/mL. The glass jars were kept at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and 75% r.h. Mortality counts were made at 24, 48, 72 and 96 h after treatment. Four replications were used for each dose.

Repellency test on filter paper

Repellency was tested using the area preference test described by (McDonald et al. 1970). The method was adapted as follows: Filter paper discs (Whatman N°1, 11 cm diameter) were cut into two equal parts. One half-disc was treated uniformly with 0.5 mL aliquots of EO solutions in acetone at doses 2, 4, 8 and 16 mL/mL. The second half-filter paper was treated with acetone as control and all the semi-discs were air-dried for 15 min. Twenty unsexed adults of *C. maculatus* were introduced to the middle of each Petri dish, which was sealed with parafilm. Four replicates were run for each of the tested concentrations. After 1 h, weevils present on both half-filters were counted. Percentage repellency (PR) values were calculated as follow:

$$\text{PR}\% = \frac{(\text{NC} - \text{NT})}{(\text{NC} + \text{NT})} \times 100$$

where NC is the insect numbers of negative control half filter paper (with 0.5 mL of acetone) and NT is that of the opposite treated half (with 0.5 mL of EO solutions in acetone). The mean repellency value was calculated and assigned to repellency classes from 0 to V according to (McDonald et al. 1970):

class 0 (PR = 0.1%), class I (PR = 0.1–20%), class II (PR = 20.1–40%), class III (PR = 40.1–60%), class IV (PR = 60.1–80%) and class V (PR = 80.1–100%).

Statistical analysis

Antioxidant activities were conducted in triplicates and results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). For insecticidal activity data, the relative percentage values in the contact and fumigant toxicity tests were corrected using the Abbott's formula:

$$M(\%) = \frac{(M_t - M_c)}{(100 - M_c)} \times 100$$

where M is the corrected insect mortality, M_t is the insect mortality in the treated population of insect and M_c is the insect mortality in the control. Data obtained from dose response bioassays (contact and fumigation) were analyzed by the US EPA probit program version 1.5 (Finney 1971) to estimate LD_{50} , LD_{95} and LT_{50} values of the EOs. All data was subjected to analysis of variance (ANOVA), and means were compared by least significant difference (LSD) using statistical software (XLstat 2016 Version 17.06). Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant.

Results and discussion

Chemical constituents of essential oil

EOs were obtained by hydro distillation of needles and twigs of *P. nigra* sp. *mauretana* and analyzed by GC-EIMS to

evaluate chemical composition. The results showed that the yield of EOs varied depending on plant parts with proportions twice as high for needles (0.47%) than twigs (0.23%). In total, 99 chemical compounds were identified. The chemical composition of the EOs is reported in Tables 1 and 2. 83 components representing 97% of the total EO, were identified in twigs while needles contained 93 components, accounting for 98%. EO of the needles extracted by hydro distillation was found to be rich in sesquiterpene hydrocarbons (67.1%) and, to a lesser extent, their oxygenated derivatives (5.5%). Other major components were monoterpene hydrocarbons (12%), followed by diterpene hydrocarbons (10.7%), oxygenated monoterpenes (1.5%), and oxygenated diterpenes (<1%). In twigs hydrodistilled oil, monoterpene hydrocarbons revealed higher amounts (63.3%) than the oxygenated monoterpenes (7.2%). Sesquiterpene hydrocarbons (6.1%) appeared as dominant in comparison with oxygenated sesquiterpenes (1.2%). The diterpene hydrocarbons (16.5%) and oxygenated diterpenes (1.7%) were also present. A comparison of needles and twigs EOs composition showed that concentrations of monoterpenes and sesquiterpenes were different, but almost all samples were found to contain α -pinene and phyllocladene (Figure 1). Indeed, the main constituents of the needles (Table 1) were β -caryophyllene (26.2%), germacrene D (17.2%), α -pinene (9.4%), phyllocladene (7.1%), d-cadinene (6.9%) and α -humulene (4.1%) while α -pinene (55.7%), phyllocladene (12.4%), cembrene (2.3%), and β -pinene (2.3%) were the most important constituents for the twigs. To summarise, comparison of the chemical composition of needles oil with that of twigs oil revealed some differences concerning the main compounds (β -caryophyllene, germacrene D, and α -pinene) and similarities concerning phyllocladene and other minor components. SPME is an innovative technique, more rapid, sensitive, and solvent-free compared to traditional methods such as HD. As mentioned by Tumen et al. (2010) when it comes comparing both techniques, it seems that SPME is more sensitive for compounds of low molecular weight that are more volatile, while steam distillation yields the majority of compounds (Table 2). Quality and quantity differences found in volatile compounds with SPME and conventional methods (HD) are reported in the literature. Differences in our results can be explained by the temperature parameter used in extraction procedure (75°C for SPME and more than 100°C for steam distillation). It is worth mentioning that we have only used one kind of fibre in the SPME extraction. So more comparative studies should be done with different fibres to be sure about the sensibility of both methods. Indeed, unlike HE, SPME revealed many more volatile compounds (mono and sesquiterpene hydrocarbons), a low percentage of oxygenated compounds (<0.5%), absence of high molecular weight volatile compounds (diterpenes) and a new class of metabolites (fatty acids) exceeding 40% (Figure 2). Most of studied EOs of Black pine subspecies consisted mainly of the abundance of monoterpenes (α -pinene, β -pinene, limonene, d-3-carene and β -phellandrene) and sesquiterpenes (germacrene D or β -caryophyllene). It is worth mentioning that the major compounds cited above were found in remarkable

Table 1. Constituents of needles and twigs essential oils of *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* causing hydrodistillation (Djurdjuran national park, north-eastern Algeria).

R.T.	L.R.I.	Constituents	Needles	Twigs
3.22	856	(E)-2-hexenal	tr	tr
3.42	869	1-hexanol	tr	tr
3.73	889	Santene	–	tr
4.02	901	Heptanal	–	tr
4.48	928	Tricyclene	tr	0.2
4.55	931	a-thujene	tr	tr
4.72	939	a-pinene	9.4	55.7
5.07	953	Camphene	0.1	1.8
5.20	957	Thuja-2,4(10)-diene	tr	0.5
5.37	961	Benzaldehyde	tr	tr
5.69	976	Sabinene	–	tr
5.78	980	b-pinene	0.5	2.3
6.04	985	6-methyl-5-hepten-2-one	tr	tr
6.13	991	Myrcene	1.5	0.9
6.54	1005	a-phellandrene	tr	tr
6.91	1018	a-terpinene	tr	tr
7.16	1027	p-cymene	tr	0.2
7.30	1031	Limonene	0.5	1.4
7.40	1035	1,8-cineole	tr	tr
7.58	1041	(Z)-b-ocimene	tr	0.1
7.93	1052	(E)-b-ocimene	tr	tr
8.30	1062	c-terpinene	tr	tr
9.35	1089	Terpinolene	tr	0.2
9.78	1100	Linalool	0.4	tr
9.99	1103	Nonanal	tr	tr
10.30	1117	Exo-fenchol	–	tr
10.61	1123	Cis-p-menth-2-en-1-ol	tr	tr
10.80	1127	a-campholenal	tr	0.6
11.30	1141	Trans-pinocarveol	tr	0.9
11.54	1143	Cis-verbenol	tr	1.7
12.25	1162	Trans-pinocamphone	–	tr
12.27	1164	Pinocarvone	–	tr
12.44	1166	p-mentha-1,5-dien-8-ol	0.2	1.1
12.73	1175	Cis-pinocamphone	–	tr
12.86	1179	4-terpineol	tr	tr
13.20	1185	p-cymen-8-ol	tr	tr
13.42	1191	a-terpineol	0.4	0.6
13.58	1192	Dihydro-carveol	tr	tr
13.67	1194	Myrtanal	tr	0.7
14.27	1206	Verbenone	tr	0.4
14.61	1219	trans-carveol	tr	0.3
15.11	1231	Cis-carveol	–	tr
15.69	1244	Carvone	–	tr
15.85	1247	Carvotanacetone	–	tr
17.50	1286	Isobornylacetate	0.2	0.5
17.80	1292	Thymol	tr	tr
17.94	1294	Trans-verbenylacetate	tr	–
18.12	1299	Trans-pinocaryylacetate	tr	–
18.20	1300	Carvacrol	–	0.4
19.22	1314	Myrtenylacetate	tr	–
19.31	1321	Neo-iso-verbanolacetate	tr	tr
20.22	1351	a-cubebene	0.4	tr
21.13	1370	Cyclosativene	0.2	tr
21.32	1376	a-copaene	0.5	tr
21.70	1384	b-bourbonene	0.2	0.4
21.79	1386	Geranylacetate	0.3	–
21.96	1390	b-cubebene	0.2	tr
22.05	1392	b-elemene	0.3	tr
22.67	1403	Methyleugenol	0.2	tr
23.17	1418	b-caryophyllene	26.2	1.8
23.58	1432	b-gurjunene	0.6	–
24.22	1439	a-guajene	–	tr
24.32	1447	Cis-murola-3,5-diene	tr	–
24.59	1455	a-humulene	4.1	0.3
24.85	1459	(E)-b-farnesene	tr	tr
24.99	1462	Cis-murola-4(14),5-diene	0.2	tr
25.19	1467	9-epi-(E)-caryophyllene	tr	tr
25.60	1477	c-murolene	3.1	0.5
25.76	1480	Germacrene D	17.2	1.9
25.96	1485	b-selinene	0.5	tr
26.26	1489	Phenylethyl 3-methyl-butanoate	1.1	0.5
26.33	1492	Valencene	2.1	tr

(continued)

Table 1. Continued.

R.T.	L.R.I.	Constituents	Needles	Twigs
26.59	1499	a-murolene	0.9	0.1
26.74	1503	Germacrene A	0.1	–
27.00	1508	(E,E)-a-farnesene	tr	tr
27.13	1513	Trans-c-cadinene	2.6	0.2
27.27	1520	Isobornyl 2-methylbutyrate	–	0.5
27.54	1524	d-cadinene	6.9	0.9
27.87	1532	Trans-cadina-1(2),4-diene	0.3	tr
28.08	1538	a-cadinene	0.3	tr
28.34	1550	Cis-a-bisabolene	0.2	–
29.21	1565	Trans-nerolidol	0.3	tr
29.59	1575	Germacrene D-4-ol	0.8	tr
29.87	1581	Caryophyllene oxide	1.3	0.7
30.92	1606	Humulene epoxide I	0.2	tr
31.15	1614	1,10-di-epi-cubenol	0.1	–
31.67	1629	1-epi-cubenol	tr	tr
32.20	1641	Tau-cadinol	1.2	0.1
32.39	1645	a-murolol	0.2	tr
32.69	1654	a-cadinol	1.4	0.4
42.61	1929	Cembrene	2.4	2.3
42.96	1941	Pimaradiene	–	tr
43.08	1975	Sclarene	0.9	1.2
43.60	1959	(3Z)-cembrene A (=neocembrene)	0.3	0.4
44.60	1989	Manoyl oxide	tr	0.6
45.30	2010	Epi-13-manool	0.3	0.5
46.53	2034	Kaur-16-ene (=phylocladene-)	7.1	12.4
47.46	2080	Abietadiene	–	0.2
50.04	2185	Sandaracopimarinal	–	0.6
		Total	98.4%	97.0%
		Essential oil yield	0.47%	0.23%

^aRT: retention time.^bLRI, linear retention indices determined on DB-5 capillary column.^ctr: trace.^d–: not detected.

quantitative differences in most available data on *Pinus nigra* subspecies worldwide (Table 3). Several authors reported that a-pinene, germacrene D and b-pinene were the dominant components present in EOs of Black pines (Kubeczka and Schultze 1987; Roussis et al. 1995; Ioannou et al. 2014). In most cases, all patterns are built on a-pinene as a major compound where content rate reached the threshold of 60%.

in *P. nigra* var. *banatica* from Serbia (Šarac et al. 2014).

Interestingly, a less frequent pattern which is worth mentioning from the results of Black pine EOs studies is that, 1-epi-bicyclosquiphellandrene was found as dominant from samples collected at two Italian sites, Friuli and Abruzzo (Vidrich et al. 1996). Some Black pines can also reveal totally different constituents at high rate such as the case of *P. nigra* ssp. *laricio* from Corsica, where the plant was found to be rich in manoyl oxide (63%), a compound of potential interest for perfumery and pharmaceutical industries (Koukos et al. 2001). For our investigated plant, qualitative and quantitative variations were found in comparison with EOs of other Black pines from European countries. Indeed, the major component present in needles of *P. nigra* ssp. *mauretanica* is totally different from the rest of available data worldwide where b-caryophyllene exhibited relatively high value (26.2%). The nature of EOs isolated from the needles in comparison with the reported data (Table 3), led us to the suggestion of the presence of a new chemotype for the Algerian *P. nigra* ssp. *mauretanica* with following chemical order: b-caryophyllene

(26.2%) > germacrene D (17.2%) > a-pinene (9.4%) > phylocladene (7.1%) > d-cadinene (6.9%) > a-humulene (4.1%)

Table 2. Chemical composition of essential oils obtained from the aerial parts of *P. nigra* ssp. *mauretanica* using SPME (Djurdjuran national park, north- ern Algeria).

R.T.	L.R.I.	Constituents	Needles	Twigs
2.63	800	Hexanal	–	0.3
4.82	939	α-pinene	29.9	88.5
5.15	953	Camphene	–	0.5
5.88	980	β-pinene	1.8	2.5
6.23	991	Myrcene	6.7	1.7
7.24	1027	p-cymene	–	tr
7.37	1031	Limonene	–	3.3
7.39	1033	β-phellandrene	3.2	–
7.65	1041	(Z)-β-ocimene	0.2	0.2
8.01	1052	(E)-β-ocimene	0.4	–
9.43	1089	terpinolene	0.2	0.1
9.85	1100	linalool	0.2	–
10.03	1103	nonanal	tr	0.1
10.98	1129	alloocimene	tr	tr
12.74	1173	menthol	tr	–
14.14	1205	decanal	tr	tr
17.56	1286	isobornylacetate	tr	0.1
17.98	1294	trans-verbenylacetate	tr	–
18.17	1299	trans-pinocaryylacetate	tr	–
19.36	1321	neo-iso-verbanolacetate	tr	–
20.28	1351	α-cubebene	0.2	–
21.18	1370	cyclosativene	tr	–
21.37	1376	α-copaene	0.2	–
21.75	1384	β-bourbonene	tr	–
22.09	1392	β-elemene	0.2	–
23.21	1418	β-caryophyllene	6.6	0.4
23.62	1432	β-gurjunene	0.2	–
24.63	1455	α-humulene	1.1	tr
25.03	1462	cis-muuro-4(14),5-diene	tr	–
25.63	1477	c-muuro-4(14),5-diene	0.4	Tr
25.79	1480	germacreneD	2.7	0.1
26.00	1485	β-selinene	tr	–
26.37	1492	valencene	0.3	–
26.62	1499	α-muuro-4(14),5-diene	tr	–
27.17	1513	trans-c-cadinene	0.2	–
27.57	1524	d-cadinene	0.4	Tr
29.91	1581	caryophylleneoxide	tr	–
36.98	1770	tetradecanoic acid	1.4	–
40.50	1871	pentadecanoic acid	1.8	–
42.60	1927	methyl hexadecanoate	0.5	–
43.15	1935	cyclohexadecanolide	1.3	–
44.20	1970	hexadecanoic acid	37.6	–
50.24	2177	octadecanoic acid	0.5	–
58.84	2400	tetracosane	–	1.9

^aRT:retention time.

^bLRI, linear retention indices determined on DB-5 capillary column.

^ctr: trace.

^d–: not detected.

>c-muuro-4(14),5-diene (3.1%). In twigs, the major compounds were found to be α-pinene followed by phyllocladene and β-pinene, a pattern close to data reported by Macchioni et al. (2003) on *P. nigra* from Italian provinces of Massa. It is well established, that EOs from plants of the same species can vary in their composition according to exogenous and endogenous factors (Barra 2009) and conifers will not escape this rule. As an example, in pine species, the composition of EOs has been noticed to range depending upon the plant part from which it was obtained (Vidrich et al. 1996), geo- graphical location, collecting period, age of the plant (Barra 2009). These quantitative and qualitative variation between subspecies worldwide should be taken into account and may be relevant for example, in chemotaxonomic studies as a complementary approach as ambiguity and controversy still exists using classical botanical approaches.

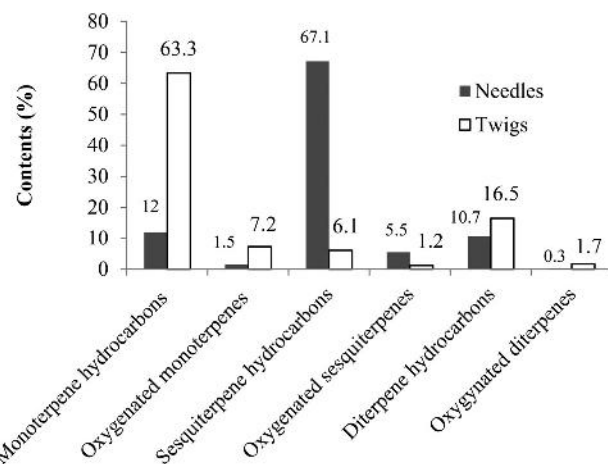


Figure 1. Major chemical groups identified in the essential oils obtained from aerial parts of *P. nigra* ssp. *mauretanica* using hydro distillation.

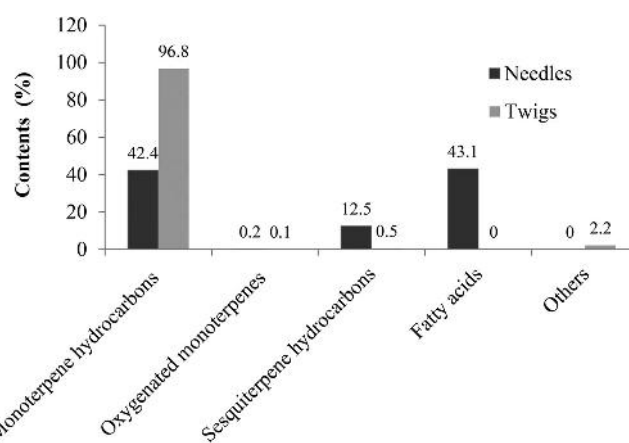


Figure 2. Major chemical groups identified in the essential oils obtained from aerial parts of *P. nigra* ssp. *mauretanica* using SPME.

Antioxidant activities

The antioxidant properties of *P. nigra* EOs were estimated by several methods: DPPH, ABTS, β-carotene, reducing power and phosphomolybdenum assays. These EOs exhibited variable antioxidant activity depending on the performed test. EO samples showed a less potency than the used standards (α-tocopherol) and pure EO compounds (β-caryophyllene and caryophyllene oxide). By comparing the IC₅₀ values, it was found that twigs retained the maximum antioxidant activity ranked in the following order: ABTS (IC₅₀: 40.43 ± 3.53 mg/mL) > DPPH (IC₅₀: 93.72 ± 6.85 mg/mL). IC₅₀ values of needles EOs were less significant with: ABTS (IC₅₀: 91.12 ± 5.56 mg/mL) > DPPH (IC₅₀: 260.93 ± 37.35 mg/mL). EOs of *P. nigra* samples and used standards showed concentration dependent activities. These results were confirmed by the ANOVA analysis (*p* < 0.05) which showed a significant difference between DPPH and ABTS tests, but not for β-carotene assay (Table 4). In addition, significant correlations were found with all used standards for the three performed tests. The low to moderate antioxidant activity of needles EO may be explained by the presence of 87% of hydrocarbon terpenes (monoterpenes and sesquiterpenes). The more reactive twigs EO is probably due to the presence of less

Table 3. Diversity of chemotypes isolated from leaves and twigs of *P. nigra* worldwide. Needles

Species/subspecies	Origin (countries, regions)	Chemotypes (major compounds)	Author(s)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i>	Bartin, Turkey	a-Pinene (27.46%) > b-Caryophyllene (11.03%) > Germacrene D (7.14%) > Sabinene (5.52%) > c-Murolene (4.98%) > b-Pinene (4.42%).	Kozan et al. (2019)
	Mileševka, Serbia	a-Pinene (24.6%) > Germacrene D (25.4%) > (E)-Caryophyllene (13.2%) > b-Pinene (8.8%) > a-Terpinyl acetate.	Mitić et al. (2018)
	Royal Botanical Garden of Madrid, Spain	a-Pinene (42.33%) > Germacrene D (30.59%) > (E)-Caryophyllene (7.43%) > b-Pinene (5.15%).	Šarac et al. (2014)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i> var. <i>pyramidata</i>	Vakıf Ormani, Anatolia, Turkey	a-Pinene (28.3%) > Germacrene D (17.3%) > b-Caryophyllene (12.9%) > b-Pinene (5.61%) > d-Cadinene (4.13%).	Ucar and Balaban (2004)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i> var. <i>pallasiana</i>	Corsica, France	a-Pinene (29%) > Germacrene D (14.9%) > b-Caryophyllene (12.9%) > b-Pinene (9.43%).	Rezzi et al. (2001)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>laricio</i>	Cambridge University Botanic Garden, UK	a-Pinene (22% 241%) > Germacrene D (17.8% 28.6%) > Myrcene (3.6% 27.7%) > (E)-Caryophyllene (5.3% 26.3%) > Limonene (2.9% 25.1%).	Ioannou et al. (2014)
	Souinet arboreta of the National Institute of Research on Rural Engineering, Water and Forests, Tunisia	a-Pinene (18%) > d-3-Carene (16.1%) > b-Caryophyllene (13.9%) > Germacrene D (12.7%) > Limonene (9.7%).	Amri et al. (2017)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>caramanica</i>	Cambridge University Botanic Garden, UK	Manool oxide (38%) > Germacrene D (16.7%) > d-Cadinene (9%) > (E)-Caryophyllene (8.9%) > a-Cadinol (4.3%).	Ioannou et al. (2014)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>nigra</i>	Serbia	b-Pinene (20.7%) > Germacrene D (20.0%) > a-Pinene (18%) > b-Caryophyllene (7.8%).	Šarac et al. (2014)
	Mileševka, Serbia	a-Pinene (45.93%) > Germacrene D (28.1%) > b-Pinene (6.90%) > (E)-Caryophyllene (7.4%).	Mitić et al. (2018)
	Royal Botanical Garden of Madrid, Spain	a-Pinene (35.4%) > Germacrene D (28.1%) > b-Pinene (10%) > (E)-Caryophyllene (7.4%).	Ioannou et al. (2014)
	Sila, Calabria, Italy	Germacrene D (32.1%) a-Pinene (19.5%) > b-Caryophyllene (16.1%) > b-Pinene (12.1%).	Bonesi et al. (2010)
		a-Pinene (25.3%) > Limonene (22.6%) > Sabinene (12.8%) > a-Terpeneol (8.3%) > b-Pinene (4.8%) > Terpinolene (4.5%).	Ioannou et al. (2014)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>salzmanii</i>	Cambridge University Botanic Garden, UK	Germacrene D (18.5%) > b-Caryophyllene (17.8%) > Limonene (12.5%) > a-Pinene (12.2%) > b-Pinene (4.1%).	Politeo et al. (2011a)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>dalmatica</i>	Central Dalmatia Vidovagora, island Brac, Croatia	a-Pinene (24.3%) b-Pinene (16%) > Germacrene D (14.6%) > b-Caryophyllene (9.6%) > Limonene (3.3%) > Bornylacetate (3.3%).	Šarac et al. (2014)
<i>P. nigra</i> var. <i>banatica</i>	Serbia	a-Pinene (58.83%) > Germacrene D (23.69%) > (E)-Caryophyllene (7.31%) > Limonene (5.04%) > b-Pinene (3.10%).	Bonesi et al. (2010)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>calabrica</i>	Parco Nazionale del Pollino, Calabria, Italy	a-Pinene (24.6%) b-Pinene (10.9%) > c-Cadinene (9.9%) > b-Phellandrene (6.3%) > Manoyloxide (6.2%) > Trans-Caryophyllene (4.2%).	Idzajtović and Pfeiffer (2001)
<i>P. nigra</i>	Zagreb, Croatia	a-Pinene (42.66%) > Germacrene D (17.72%) > b-Pinene (11.64%) > b-Caryophyllene (5.62%).	Macchioniet al. (2003)
	Central Italy	a-Pinene (28.4%) > Germacrene D (21.2%) > b-Caryophyllene (16.2%) > b-Pinene (6.2%).	Vidrich et al. (1996)
	Calabria, Italy	a-Pinene (35.14%) > l-Epibicyclosquiphellandrene (30.93%) > b-Caryophyllene (5.26%) > b-Pinene (2.80%) > d-Cadinene (1.94%) > p-Menth-1-en-8-ylacetate (1.74%).	
	Abruzzo, Italy	l-Epibicyclosquiphellandrene (23.40%) > a-Pinene (17.64%) > b-Caryophyllene (11.82%) > b-Pinene (4.40%) > d-Cadinene (3.19%) > p-Menth-1-en-8-ylacetate (2.88%) > a-Humulene (1.74%).	
	Friuli, Italy	l-Epibicyclosquiphellandrene (36.84%) > a-Pinene (11.52%) > b-Caryophyllene (9.88%) > b-Pinene (2.38%) > d-Cadinene (2.20%) > p-Menth-1-en-8-ylacetate (1.82%) > Terpinolene (1.46%) > a-Humulene (1.45%) > Limonene (1.44%).	
<i>P. nigra</i> ssp. <i>mauretanica</i>	National Park of Djurdjura, Algeria	b-Caryophyllene (26.2%) > Germacrene D (17.2%) > a-Pinene (9.4%) > Phyllocladene (7.1%) > d-Cadinene (6.9%) > a-Humulene (4.1%) > c-Murolene (3.1%).	Present study
Twigs (Branches)			
Species/subspecies	Origin (countries, regions)	Chemotypes (major compounds)	Author(s)
<i>P. nigra</i> ssp. <i>pallasiana</i>	Adana, Turkey	Germacrene D (23.5%) > a-Pinene (20%) > d-3-Carene (10.2%) > b-Caryophyllene (8.8%) > Limonene (5.5%).	Dogan and Bagci (2018)
	Adıaman, Turkey		

(continued)

Table 3. Continued. Needles

Species/subspecies	Origin (countries, regions)	Chemotypes (major compounds)	Author(s)
<i>P. nigra</i>	Antalya, Turkey	Germacrene D (23%) > a-Pinene (18.5%) > b-Caryophyllene (14.5%) > b-Pinene (13.5%) > Limonene (5.3%).	Macchionietal. (2002)
		b-Pinene (35.2 %) > a-Pinene (32 %) > Limonene (7.5 %) > Germacrene D (6.2%) > b-Caryophyllene (5.2 %).	
	Elazig, Turkey	a-Pinene (22.2 %) > b-Pinene (12.3 %) > a-Cubebene (6.3%) > d-3-Carene (6.1%) > Caryophyllene oxide (5.1 %) > Limonene (4.5 %) > b-Caryophyllene (4.1 %).	
	Tuscany, Italy	a-Pinene (70%) > Dihydrocarvone (4.6%) > Carvone (2.5 %) > b-Pinene (2.2 %) > Limonene /c- Terpinene (1.8%).	
	Piandella Fioba (Massa), Central Italy	a-Pinene (61.7 %) > Phyllocladene (11.8 %) > b-Pinene (2.8%) > Isobornylacetate (2.1%) > Camphene (1.6 %) > Limonene (1.3%) > Myrcene (1%).	
	Calabria, Italy	a-Pinene (74.63%) > b-Pinene (2.58%) > Isobornyl acetate (1.33 %) > Camphene (1.22 %).	
	Abruzzo, Italy	a-Pinene (74.63%) > Limonene (5.96%) > b-Caryophyllene (4.18%) b-Pinene (2.99%) > Isobornylacetate (1.26%).	
<i>P. nigra</i> ssp. <i>mauretanica</i>	Friuli, Italy	a-Pinene (47.18 %) > Limonene (6.44 %) b-Pinene (2.35 %) > p-Menth-1-en-8-ylacetate (2.04%) > Isobornyl acetate (1.32 %).	Present study
	National Park of Djurdjura, Algeria	a-Pinene (55.7%) > Phyllocladene (12.4%) b-Pinene / Cembrene (2.3 %) > Germacrene D (1.9 %) > Camphene / b-Caryophyllene (1.8%) > Cis-Verbenol (1.7 %) > Limonene (1.4 %) > Sclarene (1.2 %).	

Table 4. DPPH, ABTS, b-carotene bleaching antioxidant activities of needles and twigs EOs of *P. nigra* ssp. *mauretanica*.

Sample	IC ₅₀ (mg/ml)		
	DPPH	ABTS	b-Carotene
Needles	260.93±37.35 ^a	91.12±5.56 ^a	1.59±0.01 ^a
Twigs	93.72±6.85 ^b	40.43±3.53 ^c	1.44±0.16 ^a
a-Tocopherol	0.142±0.003 ^d	0.039±0.002 ^d	0.50±0.015 ^b
b-Caryophyllene	3.338±0.123 ^d	4.52±0.25 ^d	–
Caryophyllene oxide	65.34±4.64 ^c	58.02±1.72 ^b	–

Means along each column followed by the same letter(s) are not significantly different at the 5% level by Student-Newman-Keuls method.

–: Not tested.

hydrocarbon terpenes. These results of poor antioxidant performance concur well with study of Politeo et al. (2011b) on *P. nigra* ssp. *dalmatica* and also confirm findings of Sharma et al. (2015) on *P. roxburghii*, *P. wallchiana* and *P. gerardiana* where dominated fraction of monoterpenoid hydrocarbons seem to be the cause of an important change in the biological activities. Conceivable interactions between volatile compounds may interfere (Wan et al. 2008). Indeed, this low to moderate antioxidant activity may be linked to the absence of some phenolic groups known to be responsible for high radical scavenging effect (Politeo et al. 2011b). In fact, antioxidant activity had always been reported compared to the content of phenolic like carvacrol, or thymol. These phenolic compounds could be responsible for high antioxidant activity (Miladi et al. 2013). However, some researchers proved that some EOs rich in non-phenolic compounds also have antioxidant potentials which may be due to hydrocarbons like terpenes and sesquiterpenes. Other factors (solubility of the compounds or stereo-selectivity of radicals) in different antioxidant protocols can modify the ability of the oil to reduce many radicals (Grassmann 2005;

Postu et al. 2019). *P. nigra* EO activities are still important compared with above cited pine species. According to Yener et al. (2014) and Politeo et al. (2011b), needle EOs of *P. nigra* and *P. nigra* ssp. *dalmatica* from Turkey and Croatia exhibited very low scavenging DPPH* at concentrations < 1 mg/mL. Interestingly, these results corroborated with our study, where significant activities were obtained with the concentrations > 1 mg/mL. It is plausible that a number of limitations could have influenced the result either related to particular experimental conditions in the DPPH tests (Apetrei et al. 2013) or other external parameters. As an example, antioxidant activities on some pine species i.e., *P. strobus* revealed a significant decreasing two to four times from winter to summer (Anderson et al. 1992). The evaluation of the antioxidant activity should be carried out by more than one test method (Alam et al. 2013). A performed ABTS test revealed a significant antioxidant effect with IC₅₀ of 91.12±5.56 mg/mL and 40.43±3.53 mg/mL for needles and twigs, respectively. ABTS and DPPH are reliable methods to test antioxidant capacity especially appropriate in the investigation of hydrophilic and lipophilic antioxidants (Kedare and Singh 2011; Sivakumar and Meera 2013). ABTS and DPPH presented the best potency compared with b-carotene test where better activities were recorded at low concentrations (1–5 mg/mL). b-carotene/linoleic acid method is useful for studies of lipophilic antioxidants (Andrade et al. 2013). However, the method has been widely criticized due to its low reproducibility and problematic quantification (Prieto et al. 2012). b-carotene activities in twigs (IC₅₀ = 1.44±0.16 µg/mL) exhibited much lower potency than that of a-Tocopherol (0.50±0.015 µg/mL), but much higher than that of needles (IC₅₀ = 1.59±0.01 µg/mL).

The reducing power activity was based on the reduction of ferric (Fe³⁺) to ferrous (Fe²⁺) in the presence of

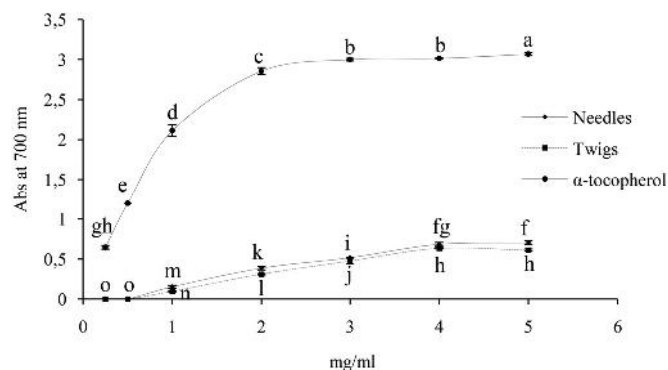


Figure 3. Reducing power of *P. nigra* needles and twigs oils. (a-i are notation of the level of statistical differences).

antioxidants (Goze et al. 2009). Figure 3 shows that the reducing power of both EOs and α-tocopherol increased gradually with increasing concentration. The needles show a high activity for all concentrations than twigs with significant differences ($p < 0.05$). Comparing to the α-tocopherol at 0.25 mg/mL, twigs EO (at 4 and 5 mg/mL) and needles EO (at 4 mg/mL) show no significant differences ($p < 0.05$). High activity was recorded at 5 mg/mL with significant differences ($p < 0.05$) for needles. Our results were higher than those reported by Ulukanli et al. (2014), regarding the reducing power of *P. pinea* and *P. brutia* EO at 20 mg, which found to be higher than that of α-tocopherol (10 mg). The result of the reducing power of EOs appeared to be better than those of the bleaching of ABTS derived radical cations and the bleaching of DPPH radicals.

Antioxidant activity assessed by phosphomolybdenum exhibited positive linear regression for both tested plant parts (Figure 4). Needle EO revealed slightly higher activity compared to twigs at concentrations of 0.03125 and 0.0625 mg/mL, with a non-significant difference ($p < 0.05$) while at concentrations of 0.125 and 0.25 mg/mL twigs are more positive than needles. This latter particularly exhibited high radical scavenging property at 0.5 mg/mL. Comparing to Ascorbic acid, both EOs presented high activity at concentration 0.03125 and 0.0625 mg/mL while low activities were recorded at 0.125, 0.25 and 0.5 mg/mL.

In conclusion, phosphomolybdenum assay showed best antioxidant among all of the tested samples, compared with DPPH, ABTS, β-carotene and reducing power systems. Unfortunately, there is no pertaining studies on the antioxidant potentials of *P. nigra* ssp. *mauretanica* targeting both twigs and needles to compare with our results. Thereby, the antioxidant action mechanism cannot be understood without recourse to diverse existing hypotheses such as for example, considering the influence of a variety of active phytochemicals, including: vitamins, carotenoids, terpenoids, alkaloids, flavonoids, lignans, simple phenols, phenolic acids (Gupta and Rajpurohit 2011), presence or absence of hydrocarbons components (Villaro et al. 2007), extraction/detection methods (Apetrei et al. 2013).

Insecticidal activities

The present study revealed that EOs of both plant parts were toxic and repellent to *C. maculatus* adults. Significant

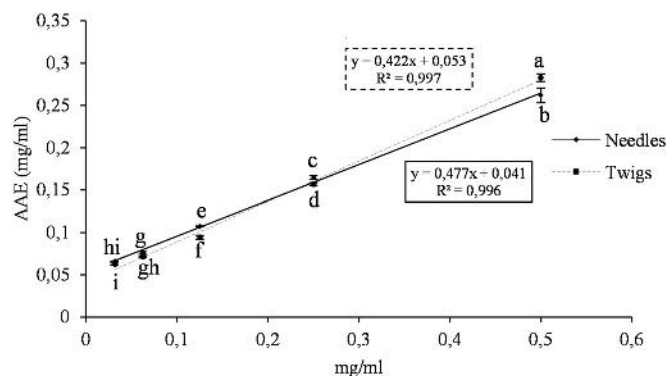


Figure 4. Total antioxidant activity of *P. nigra* needles and twigs oils. (a-i are notation of the level of statistical differences).

results were observed with dose-related increases for all completed tests. The mortality calculated from the Probit-log model is expressed in lethal doses with their confidence limits. The slope and Chi2 (χ^2) express the toxicity of the EO. The Chi2 expresses the fit test of the model that is not significant at 5% (Table 5).

In contact toxicity assay, data of cumulative mortality against *C. maculatus* adults along four days of exposure indicated that both EOs were toxic, but at different concentrations. The most active EO was that of needles at a concentration of 21 L/mL where 50% of the mortality was recorded while for the twigs, this rate was reached at a much higher concentration (161 L/mL). EOs from needles appear to be the most toxic against adults of *C. maculatus* with LD50 of 1.058 L/mL and LD95 of 62.615 L/mL. EOs extracted from the twigs after four days of treatment showed less convincing results with LD50 (6.23 L/mL) and LD95 (156.23 L/mL). For needles and twigs, contact toxicity was found to be more effective than inhalation test in killing adults of *C. maculatus* (Table 5). In Effects of inhaling EOs, LT50 varied differently with values of 155.583 h (in needles) and 287.509 h (in twigs).

EOs may affect negatively development, emergence and egg mortality of various pests. Indeed, EOs can regulate or inhibit the development cycle of insect pests of stored products such as *C. maculatus* (Magdalena 2009; Rajashekar et al. 2014; Mossa 2016). Hedjal-Chehhebet al. (2013) reported that a dose of 50 L of EOs of some conifer species affected very significantly the longevity, fecundity and emergence of *C. maculatus*. Koutsaviti et al. (2014) demonstrated that various EOs of *Pinus* species (including *P. nigra*) could serve primarily as an alternate agent of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) repellency. In repellency test, both EOs of *P. nigra* showed a dose-dependent repellency towards *C. maculatus* adults with maximum repellency recorded at 16 L/mL with 67.5 ± 0.95 and 70 ± 0.81 % for needles and twigs, respectively. The analysis of variance showed significant differences ($p < 0.05$) in weevil responses at 8 L/mL for all oils tested, but no significant differences were observed for the repellent effect of 2, 4 and 16 L/mL, inducing thus a repellency class III (Moderately Repulsive), according to McDonald et al. (1970).5

The Black pine EO showed moderate repellent properties tested against weevil cowpea adults. The probable reasons for this could be the short duration of exposure and the concentration of oils (Hedjal-Chehhebet al. 2013; Toudert-Taleb

Table 5. Comparative toxicity of essential oil extracted from *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* against *C. maculatus*.

Plant part	LD ₅₀ (ml/ml) (min-max)	LD ₉₅ (ml/ml) (min-max)	v ²	Fit of probit line		Slope ± SE	LT ₅₀ (Hour) (min-max)
				P. value	Intercept		
Contact toxicity bioassay							
Needles	1.058 (0.211-1.933)	62.615 (25.712-778.910)	3.268	0.05	4.977	0.928 ± 0.234	53.738 (49.946-57.783)
Twigs	6.235 (4.683-8.521)	156.235 (62.648-1086.932)	2.710	0.05	4.065	1.175 ± 0.218	104.364 (94.480-118.607)
Fumigant toxicity bioassay (inhalation test)							
Needles	14.741 (9.272-46.498)	1546.030 (222.521-719068.938)	1.462	0.05	4.048	0.184 ± 0.217	155.583 (127.553-210.874)
Twigs	28.767 (15.326-181.742)	2631.784 (313.505-2661801.500)	0.613	0.05	3.776	0.838 ± 0.227	287.509 (198.025-558.229)
Percent Repellency (PR) (mean ± SE)							
Concentration (ml/ml)	2	4	8		16		McDonald class (mean ± SD)
Needles	15 ± 2.51 ^b	42.5 ± 1.7 ^{ab}		45 ± 1.73 ^{ab}		67.5 ± 0.95 ^a	(42 ± 1.72)
Twigs	27.5 ± 1.5 ^b	40 ± 0.81 ^{ab}		60 ± 0.5 ^a		70 ± 0.81 ^a	(49.37 ± 0.095)

LD₅₀: Dose necessary to cause death of 50% of the tested insects (Median Lethal dose); LD₉₅: Dose necessary to cause death of 95% of the tested insects LT₅₀: Average lethal time (50 % survival time of the tested insects).

In PR test: Means along each column followed by the same letter(s) are not significantly different at the 5% level by Student-Newman-Keuls method.

etal. 2014). We must draw attention that EO components may modulate (synergy) or alter the effects of other ones (antagonism) (Okoh et al. 2011).

The nature of our investigations on insecticidal activity makes it difficult to generalize results on *P. nigra* as this is still not well documented.

Conclusion

As far we know, this is the first study, that investigated the chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of EOs of *P. nigra* ssp. *mauretanica* naturally grown in northern Algeria. Comparison with available data of close subspecies studied mainly in Turkey and Italy showed chemical divergences. Indeed, the Algerian Black pine needles were characterized by a high content of β -caryophyllene (26.2%) and relatively low content of α -pinene (9.4%) while in populations from European subspecies, proportions are in most cases reversed. The chemical composition of both analyzed aerial parts (leaves and twigs) collected during the full bloom of the tree revealed a new chemotype for the leaf (β -caryophyllene (26.2%) > germacrene D (17.2%) > α -pinene (9.4%) > phyllocladene (7.1%) > δ -cadinene (6.9%) > α -humulene (4.1%) > α -muurolene (3.1%)). On the other hand, twigs exhibited a chemotype similar to that of *P. nigra* from the central Italian provinces of Massa (Macchioni et al. 2003) where the fraction of the three major components are closer. Qualitative and quantitative differences were observed in chemical composition, depending on both plant parts and extraction procedures as reported by many authors. For the DPPH, ABTS and β -carotene antioxidant systems, the twigs oil showed a high level than needles, unlike to reducing power test. In phosphomolybdate system, both analyzed EOs revealed the best antioxidant potential comparatively with others used antioxidant systems. Finally, EOs demonstrated important anti-insecticidal activity against *C. maculatus*, important pests of pulses. Both EOs have effects with variable rate depending on plant parts, dose, duration and frequency of exposure. These findings suggest that EOs of the studied plant have potential to be developed into natural antioxidant and food systems, bio-control of stored product pest and last not least

for assessment and conservation program concerns where chemotaxonomic studies may contribute as a complementary botanical approach, because much uncertainty and debate still exist on taxonomic status of Black pine subspecies.

Acknowledgements

The authors are grateful to staff of the National Park of Djurdjura (Kabylia, Algeria), especially Moussa Haddad for helping us to access to the Nature Reserve, Dr. Nordine Benkhennouche for his precious help in field works by collecting plant material and Dr. Leila Bensidhoum for her assistance in some experiments.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

ORCID

A. Braca  <http://orcid.org/0000-0002-9838-0448>

References

- Abi-Ayad M, Abi-Ayad FZ, Lazzouni HA, Rebiahi SA. 2011. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). J Nat Prod Plant Resour. 1(1):33–36.
- Adams RP. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream (IL): Allured.
- Afzal-Rafii ZARA, Dodd RS. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. Mol Ecol. 16 (4): 723–736.
- Ait Mimoun N, Ait Mimoun D, Yataghene A. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pinus pinaster*. J Coast Life Med. 1(1):55–59.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods of evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J. 21(2):143–152.
- Amril, Hanana M, Jamoussi B, Hamrouni L. 2017. Essential oil of *Pinus nigra* JF Arnold subsp. *laricio* Maire: Chemical composition and study of their herbicidal potential. Arab J Chem. 10: S3877–S3882.
- Anderson JV, Chevone BI, Hess JL. 1992. Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles: evidence for thermal dependence. Plant Physiol. 98 (2):501–508.

- AndradeMA, dasGracasCardosoM, deAndradeJ, SilvaLF, TeixeiraML, Valerio Resende JM, da Silva Figueiredo AC, Barroso JG. 2013. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparunaguianensis*. *Antioxidants (Basel)*. 2(4):384–397.
- Apetrei LC, Spac A, Brebu M, Tuchilus C, Miron A. 2013. Composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of a full grown tree of *Pinus cembra* L. from the Calimani mountains (Romania). *J Serb Chem Soc*. 78 (1):27–37.
- Atalay I, Efe R. 2012. Ecological attributes and distribution of Anatolian black pine [*Pinus nigra* Arnold. subsp. *pallasiana* Lamb. Holmboe] in Turkey. *J Environ Biol*. 33:509–519.
- BarraA. 2009. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Nat Prod Commun*. 4(8):1147–1154.
- Berroukche A, Amara S, Halimi S, Benyamina F. 2014. Evaluation of the leave and bud decoctions *Pinus halepensis* mill. Effects on the induced-phenol renal toxicity in wistar rats. *J Fundam Appl Sci*. 6(2):197–207.
- Bonesi M, Menichini F, Tundis R, Loizzo MR, Conforti F, Passalacqua NG, Statti GA, Menichini F. 2010. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Pinus* species essential oils and their constituents. *J Enzym Inhib Med Ch*. 25(5):622–628.
- Sivakumar ChV, Meera I. 2013. Antioxidant and Biological Activities of Three Morphotypes of *Murraya koenigii* L. from Uttarakhand. *J Food Process Technol*. 4(7):1–7.
- Davies NW. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *J Chromatogr A*. 503:1–24.
- Djerrad Z, Djouahri A, Kadik L. 2017. Variability of *Pinus halepensis* Mill. Essential oils and their antioxidant activities depending on the stage of growth during vegetative cycle. *Chem Biodiversity*. 14(4):e1600340.
- Dob T, Berramdane T, Chelghoum C. 2007. Essential oil composition of *Pinus halepensis* Mill. from three different regions of Algeria. *J Essent Oil Res*. 19 (1):40–43.
- Dob T, Berramdane T, Chelghoum C. 2005. Chemical composition of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria. *CR Chimie*. 8(11-12):1939–1945.
- Dogan G, Bagci E. 2018. Chemical Composition of Essential Oil of *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Pinaceae) Twigs, From Different Regions of Turkey. *J Essent Oil Bear Pl*. 21(2):511–519.
- Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. 2007. Composition and chemical variability of the twig oil of *Abies alba* Miller from Corsica. *Flavour Fragr J*. 22(4):293–299.
- Enescu CM, de Rigo D, Caudullo G, Mauri A, Houston Durrant T. 2016. *Pinus nigra* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *Eur Atlas Forest Tree Spec*. 6:126–127.
- Farjon A. 2018. The Kew review: conifers of the world. *Kew Bull*. 73:8. DOI:10.1007/s12225-018-9738-5.
- Fekih N, Allali H, Ait AA, Merghache S, Maghnia D, Costa J. 2016. Chemical composition and antimicrobial potency of essential oils from roots of *Pinus* growing in Algeria. *PhytoChemBioSubj*. 10(3):96–102.
- Fekih N, Allali H, Merghache S, Bouchentouf S, Costa J. 2019. Invitro assessment of two species of the genus *Pinus* growing in Algeria for their antimicrobial and antioxidant activity. *Agric Conspec Sci*. 84(1):103–114.
- Fekih N, Allali H, Merghache S, Chaïb F, Merghache D, El Amine M, Djabou N, Muselli A, Tabti B, Costa J. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pac J Trop Dis*. 4 (2):97–103.
- Finney DJ. 1971. Probit analysis, 3rd ed. London: Cambridge University Press, p. 350.
- Ghazian F, Sadati S, Khanavi M, Mohammad-Taghizadeh-Kashani L. 2016. Chemical composition, radical scavenging and b-carotene bleaching assay of essential oils from *Citrus aurantifolia*, *Citrus sinensis* Peel, and *Zataria multiflora* aerial parts. *Trad Integr Med*. 1:59–65.
- Goze I, Alim A, Tepe AS, Sokmen M, Sevgi K, Tepe B. 2009. Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. *J Med Plants Res*. 3:246–254.
- Grassmann J. 2005. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm*. 72: 505–535.
- Gupta AD, Rajpurohit D. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of nutmeg (*Myristica fragrans*). In: Preedy VR, Watson RR, Patel VB, editors. Nuts & seeds in health and disease prevention. 1st ed. London, Burlington, San Diego: Elsevier; p. 831–839.
- Hedjal-Chehheb M, Toudert-Taleb K, Khoudja ML, Benabdesselam R, Mellouk M, Kellouche A. 2013. Essential oils compositions of six conifers and their biological activity against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Bruchidae) and *Vigna unguiculata* seeds. *Afr Entomol*. 21(2):243–254.
- Idzajt M, Pfeiffer HW. 2001. Composition of volatiles from needles of *Pinus nigra* Arnold, *P. sylvestris* L. and their hybrids. *Sauteria*. 11: 367–382.
- Ioannou E, Koutsaviti A, Tzakou O, Roussis V. 2014. The genus *Pinus*: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species. *Phytochem Rev*. 13 (4):741–768.
- Jennings W, Shibamoto T. 1980. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. New York: Academic Press.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem*. 94(4):550–557.
- Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 48(4):412–422.
- Keeley JE. 2012. Ecology and evolution of pine life histories. *Ann Sci*. 69(4):445–453.
- Koukos P, Papadopoloulou K, Papagiannopoulos A, Patiaka DT. 2001. Essential oils of the twigs of some conifers grown in Greece. *Holz als Roh-und werkstoff*. 58(6):437–438.
- Koutsaviti K, Giatropoulos A, Pitarokili D, Papachristos D, Michaelakis A, Tzakou O. 2014. Greek *Pinus* essential oils: larvicidal activity and repellency against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res*. 114 (2):583–592.
- Kozan E, İlhan M, Tuçmen I, Akkol EK. 2019. The scolicidal activity of the essential oil obtained from the needles of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe on hydatid cyst. *J Ethnopharmacol*. 235:243–247.
- Kubeczka K, Schultze W. 1987. Biology and chemistry of conifer oils. *Flavour Fragr J*. 2(4):137–148.
- Kurti F, Giorgi A, Beretta G, Mustafa B, Gelmini F, Testa C, Angioletti S, Giupponi L, Zilio E, Pentimalli D, et al. 2019. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of different *Pinus* species from Kosovo. *J Essent Oil Res*. 31 (4):263–275.
- Lange M, Spanoudaki M. 1995. The composition of an oleoresin of *Pinus montezumae* Lamb. from Guatemala. *Holz als Roh-und Werkstoff*. 53(1):68–71.
- Liber Z, Nikolic T, Mitić B, Satović Z. 2003. RAPD markers and black pine [*Pinus nigra* Arnold] intraspecific taxonomy-evidence from the study of nine populations. *Acta Soc Bot Pol*. 72(3):249–257.
- Lim Y, Quah E. 2007. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chem*. 103(3):734–740.
- Liu Q, Yao H. 2007. Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chem*. 102(3):732–737.
- Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Maccioni S, Ansaldi M. 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour Fragr J*. 18(2):139–143.
- Macchioni F, Cioni PL, Flamini G, Morelli I, Perrucci S, Franceschi A, Macchioni G, Ceccarini L. 2002. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *J Agric Food Chem*. 50(16):4586–4588.
- Magdalena WM. 2009. Effect of plant essential oils on the development and fertility of grain weevil (*Sitophilus granarius* L.). *J Cent Eur Agric*. 10:357–360.
- McDonald LL, Guy RH, Speirs RD. 1970. Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insects. Marketing Research Report No. 882. Washington (DC): Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture.
- Meddour R, Meddour-Sahar O. 2015. Medicinal plants and their traditional uses in Kabylia (Tizi Ouzou, Algeria). *Arabian J Med Aromat Plants*. 1(2):137–151.
- Merah S, Dahmane D, Krmat S, Metidji H, Nouasri A, Lamari L, Dob T. 2018. Chemical analysis of phenolic compounds and determination of

- anti-oxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of organic extracts of *Pinus coulteri*. Bangladesh J Pharmacol. 13(2):120–129.
- Miladi H, Slama RB, Mili D, Zouari S, Bakhrouf A, Ammar E. 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. NS. 5(6):729–739.
- Mitić ZS, Jovanović B, Jovanović CŠ, Mihajilov-Krstev T, Stojanović C-Radić ZZ, Cvetković VJ, Mitrović TL, Marin PD, Zlatković BK, Stojanović CGS. 2018. Comparative study of the essential oils of four *Pinus* species: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. Ind Crop Prod. 111:55–62.
- Mossa A-TH. 2016. Green pesticides: essential oils as biopesticides in insect-pest management. J Environ Sci Technol. 9(5):354–378.
- Mumm R, Tiemann T, Schulz S, Hilker M. 2004. Analysis of volatiles from black pine (*Pinus nigra*): significance of wounding and egg deposition by a herbivorous sawfly. Phytochemistry. 65(24):3221–3230.
- Ochockaj R, Asztemborska M, Sybilka D, Langa W. 2002. Determination of enantiomers of terpenic hydrocarbons in essential oils obtained from species of *Pinus* and *Abies*. Pharm Biol. 40(5):395–399.
- Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ. 2011. Antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydro-distillation and solvent free microwave extraction. Afr J Biotechnol. 10 (20): 4207–4211.
- Pisoschi AM, Negulescu GP. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review. Biochem Anal Biochem. 1:1–10.
- Politeo O, Botica I, Bilusic T, Jukic M, Carev I, Burcul F, Milos M. 2011b. Chemical composition and evaluation of acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oil from Dalmatian endemic species *Pinus nigra* Arnold ssp. *dalmatica* (Vis.) Franco. J Med Plan Res. 5(30):6590–6596.
- Politeo O, Skocibusic M, Maravic A, Ruscic M, Milos M. 2011a. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic Dalmatian black pine (*Pinus nigra* ssp. *dalmatica*). Chem Biodivers. 8(3):540–547.
- Postu PA, Sadiki FZ, Elidrissi M, Cioanca O, Trifan A, Hancianu M, Hritcu L. 2019. *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. Biomed Pharmacother. 112:108673.
- Prieto MA, Rodríguez-Amador V, Azquez JA, Murado MA. 2012. b-Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. J Agric Food Chem. 60(36):8983–8993.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. Anal Biochem. 269(2):337–341.
- Quezel P, Médail F. 2003. Ecologie et biogéographie des forêts méditerranéennes. Collection Environnement. France: Elsevier, 576p.
- Quezel P, Santa S. 1962. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. C.N.R.S., Paris. ed.
- Rajashekar Y, Ravindra KV, Bakthavatsalam N. 2014. Leaves of *Lantana camara* Linn. (Verbenaceae) as a potential insecticide for the management of three species of stored grain insect pests. J Food Sci Technol. 51(11):3494–3499.
- Ramdani M, Haichour R, Lograda T, Chalard P, Figueredo G. 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pinus halepensis* from Algeria. Biodiversitas. 21(9):4345–4360.
- Rangkadilok N, Sitthimonchai S, Worasuttayangkurn L, Mahidol C, Ruchirawat M, Satayavivad J. 2007. Evaluation of free radical scavenging and antioxidant activities of standardized longan fruit extract. Food Chem Toxicol. 45(2):328–336.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. 2002. Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using ¹³C-NMR spectroscopy. Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. Appl Spectrosc. 56(3):312–317.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. 2005. Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica. Ind Crop Prod. 21(1):71–79.
- Rezzi S, Bighelli A, Mouillot D, Casanova J. 2001. Composition and chemical variability of the needle essential oil of *Pinus nigra* subsp. *laricio* from Corsica. Flavour Fragr J. 16(5):379–383.
- Roussis V, Petrakis PV, Ortiz A, Mazomenos BE. 1995. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. Phytochemistry. 39(2):357–361.
- Rubio-Moraga A, Candel-Perez D, Lucas-Borja ME, Tiscar PA, Vinéglab, Linares JC, Gómez-Gómez L, Ahrazem O. 2012. Genetic diversity of *Pinus nigra* Arn. populations in southern Spain and northern Morocco revealed by inter-simple sequence repeat profiles. Int J Mol Sci. 13(5): 5645–5658.
- Sadou N, Seridi R, Djahoudi A, Hadeff Y. 2015. Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. Synthèse. 30(30):33–39.
- Sarac Z, Matejić J, Stojanović C-Radić ZZ, Veselinović J, Džamić AM, Bojović S, Marin PD. 2014. Biological activity of *Pinus nigra* terpenes—evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. Comput Biol Med. 54:72–78.
- Sharma A, Goyal R, Sharma L. 2015. Potential biological efficacy of *Pinus* plant species against oxidative, inflammatory and microbial disorders. BMC Complement Altern M. 16 (1):35.
- Silori GK, Kushwaha N, Kumar V. 2019. Essential oils from pines: chemis-try and applications. In: Malik S, editors. Essential oil research. Cham: Springer; p. 275–297.
- Stenhagen E, Abrahamsson S, McLafferty F. 1974. Registry of mass spectral data. J. Wiley & Sons, New York.
- Swiger A, Silverstein R. 1981. Monoterpenes. Milwaukee (WI): Aldrich Chemical Co.; IV + 130pp.
- Tapondjou LA, Adler C, Bouda H, Fontem DA. 2003. Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de "*Chenopodium ambrosioides*" et "*Eucalyptus saligna*" al'égard de la bruchide uni-éb'e, "*Callosobruchus maculatus*" Fab. (Coleoptera: Bruchidae). Cah Agric. 12: 401–407.
- Tobolski JJ, Zinkel DF. 1982. Variation in needle and cortex resin acids during shoot development in *Pinus sylvestris*, *P. nigra*, and *P. strobus*. Forest Sci. 28:785–796.
- Toudert-Taleb K, Hedjal-Chebheb M, Hami H, Debras JF, Kellouche A. 2014. Composition of essential oils extracted from six aromatic plants of Kabylia origin (Algeria) and evaluation of their bioactivity on *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Bruchidae). Afr Entomol. 22(2):417–427.
- Treep L. 1976. Lechoix des espèces forestières en Algérie. Une étude des arboretums du centre national de recherche et d'expérimentation forestière en rapport avec la situation forestière en Algérie. NRF, Algérie.
- Tumen I, Hafizoglu H, Kilic A, Doğanmez I, Sivrikaya H, Reunanen M. 2010. Yields and constituents of essential oils from cones of Pinaceae spp. native grown in Turkey. Molecules. 15(8):5797–5806.
- Ucar G, Balaban M. 2004. Volatile needle extracts of Anatolian black pine varieties: *P. nigra* subsp. *Pallasiana* var. *pallasiana* and var. *pyramidata*. Biochem Syst Ecol. 32(11):983–992.
- Ulukanli Z, Karaboğruklü S, Bozok F, Burhan A, Erdogan S, Cenet M, Karaaslan MG. 2014. Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils. Chin J Nat Med. 12(12):901–910.
- Ustun O, Senol FS, Kurkcuoğlu M, Orhan IE, Kartal M, Baser KHC. 2012. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. Ind Crop Prod. 38:115–123.
- Vidrich V, Fusi P, Michelozzi M, Franci M. 1996. Analysis of Essential Oils from Leaves and Branches of Different Italian Provenances of *Pinus nigra* Arn. J Essent Oil Res. 8(4):377–381.
- Villanueva D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. Talanta. 71(1):230–235.
- Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. Food Chem. 108 (3):1019–1022.
- Yener HO, Saygıdeğer SD, Sarıkurkcu C, Yumrutas O. 2014. Evaluation of antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of *Pinus* species. J Essent Oil Bear Pl. 17(2):295–302.

Chemical profile, enzyme inhibitory and antioxidant activities of essential oils of an endemic Algerian species: *Abies numidica*. De Lannoy ex Carrière.

Abdenour Adjaoud^a, Hocine Laouer^b, Olivera Politeo^c, Hocine Abbaci^d, Franko Burčul^e, Kamal Moussi^a, Ouarda Adjaoud-Benkhellat^f, Mathieu Paoli^g and Félix Tomi^g

^aDépartement des Sciences Biologiques de l'Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algérie

^bLaboratory of Natural Resources Valorization, Department of Biology and Plant Ecology, Ferhat Abbas University, Setif-1, Algeria

^cDepartment of Biochemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, R. Boškovića 35, HR-21000 Split, Croatia

^dLaboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algeria

^eDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry and Technology, University of Split, Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

^fLaboratoire de Recherche Ecologie & Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, 06000 Bejaia, Algérie

^gUMRSPE6134, Université de Corse-CNRS, Equipe Chimie et Biomasse, 20000 Ajaccio, France

Abstract

The essential oils (EOs) from needles, twigs and cones of *Abies numidica* De Lannoy ex Carrière, an endemic tree from Algeria, were obtained by hydro distillation and analysed by gas chromatography (GC), gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), and ¹³C nuclear magnetic resonance (¹³CNMR). Based on the results, fifty, forty-nine, and thirty-eight components from needles, twigs, and cones were identified accounting for 86.0%, 93.5%, and 93.8% of the total EO, respectively. EOs were mainly composed of monoterpene hydrocarbons (MH) (46.3%-86.0%), followed by sesquiterpene hydrocarbons (SH) (2.6%-33.6%), oxygenated sesquiterpenes (SO) (0.9%-4.7%) and oxygenated monoterpenes (MO) (1.4%-15.7%). EOs differed in their percent composition, represented essentially by α -pinene with the range of 17.6%-59.7 %, limonene (2.1%-40.7 %), β -pinene (5.6%-12.9%) and camphene (0.4%-10.9%). The antioxidant activity was determined using five tests: ABTS, β -carotene bleaching, DPPH, FRAP and phosphomolybdenum. Cholinesterase inhibition potential of EOs was also evaluated. EO of each plant part exhibited various degrees of antioxidant activities depending on performed test indicating potential importance of the plant. EO of cones was found to have the highest antioxidant activity for most of the tests performed. All EOs exhibited better

antiacetylcholinesterase (AChE) than antibutrylcholinesterase (BChE) activities at various rates. The most potent AChE inhibition was observed for twigs EO ($IC_{50}=2.73 \mu\text{g/mL}$), followed by needles ($IC_{50}=4.09 \mu\text{g/mL}$) while cones EO showed least potential ($IC_{50}=13.64 \mu\text{g/mL}$).

Keywords: *Abies numidica*, Chemical composition, Antioxidants, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase

Background

The region of Kabylia has a rich flora highlighted by several biodiversity hotspots representing one of the main centres of plant species richness in the country. In addition, the region is also home to one of the largest forest covers in the country, where unique trees are growing naturally such as *A. numidica*, an endemic species which is under severe threats due to loss of habitat. Besides our interests on the research of high value biocompounds, acquiring data on chemical profiles of different parts of the tree may contribute to better understanding of the species phylogeny. Indeed, relationships between chemotypes and genetic diversity of natural populations of closely related species are more and more considered using modern approach such as chemosystematics.

Introduction

Several studies have revealed the therapeutic potentials of EOs derived from *Abies* species, members of subfamily Abietoideae (Pinaceae). The genus *Abies* is represented in Algeria by one species only (*Abies numidica*, DeLannoy ex Carrière) and known as the fir of Numidia. It is an endemic species distributed on the tops of mountains of Babor and Tababort (Petite Kabylie). The trees of this species occupy small areas less than 300 hectares in total (1). These two localities are the main known natural habitats and for conservation concerns, *A. numidica* was also introduced outside its natural range, especially in the eastern forests (Tellian areas). The tree seems to take hold gradually by regenerating naturally in *ex situ* areas such as Seraïdi mountains (Annaba). The cones were used in traditional medicine against cold, abdominal pain, respiratory illness and vascular diseases while other parts of the plant are used in various preparations including medicinal turpentine oils and tar extraction. Fir gum is used as an antiscorbutic and antiseptic, or for wounds treatment and burns soothing (2). So far, no ethnobotanical studies have been undertaken to clarify traditional uses of *A. numidica*, at least around its distribution area. Several studies on different *Abies* species worldwide have shown various activities, such as antimicrobial, antifungal, antitumor, anti-inflammatory, anxiolytic, etc. (3-18). In contrast, it is possible that due to its conservation status and limited population, not much attention has been paid to *A. numidica*. Only a few studies concerning *A. numidica* have been published, focusing on three main areas: phytosociology, ecophysiology, and conservation (19-22), phytochemical profiles, antioxidants and antimicrobial (10, 11, 15, 16, 18). *A. numidica* is poorly investigated when compared to other *Abies* species. It is also noteworthy that the few existing studies have mainly focused on needles extraction and no attention has been paid to treat other plant parts simultaneously. Alzheimer's disease (AD) accounts for 60-70% of cases of dementia worldwide, with a prevalence of 24.3 million cases (23). Particular attention was paid to this activity, as it is relevant to the treatment of AD. In the last decade, investigations on EOs from various plants as potential acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors have attracted much attention of research teams worldwide (24-26). These enzymes play a crucial role in the breakdown of the neurotransmitter acetylcholine, and their inhibition has been linked to the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's (25). Our study was carried out on needles, twigs and cones of *A. numidica* by comparing their EO chemical composition, their antioxidants and enzymatic inhibitory properties.

Materials and Methods

Plant Material and essential oil extraction

Aerial parts (needles, twigs and cones) of *A. numidica* were collected in January 2011 from Tababort mountains (altitude 1420 m, latitude 36° 32' 52.17" N, longitude 5° 27' 10.74" E), in northern Algeria. Collected material was carefully checked by removing infected parts *in situ*, and a voucher specimen was deposited in the collection herbarium at the laboratory of valorization of natural biological resources, university of Setif 1, Algeria. Fine dried chopped needles, twigs and cones (150 g each) were hydrodistilled separately using a Clevenger-type apparatus for 3 h. All extracted EOs were dried using anhydrous Na₂SO₄, filtered and stored at 4 °C in dark until use. EO yields were estimated on a dry weight (w/w).

All extracted EOs, as well as the subsequent experiments, were conducted in the same year (2011)

Chemicals

All reagents and solvents used were of analytical grade. Acetylcholinesterase (AChE, from *Electrophorus electricus* – electric eel, type V-S), butyrylcholinesterase (BChE, from equine serum), acetylthiocholine iodide (ATChI), butyrylthiocholine iodide (BTChI), 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Ellman's reagent), β -caryophyllene, β -pinene, caryophyllene oxide, carvone and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany) (purity 97.5 to 99%); ferric chloride (FeCl₃), α -tocopherol, ammonium molybdate ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), linoleic acid, Tween 20 and β -carotene were purchased from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, USA); sodium phosphate (Na₃PO₄), sodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄), sodium dihydrogen phosphate (NaH₂PO₄), potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆), trichloroacetic acid (C₂HCl₃O₂), sulfuric acid (H₂SO₄), potassium persulfate (K₂S₂O₈) and chloroform from Biochem Chemopharma (Cosne sur Loire, France; ascorbic acid from Prolabo, (Carnot, France).

Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID)

GC analyses were performed on a Perkin Elmer Clarus 500 gas chromatograph equipped with flame ionization detector (FID) and 2 fused silica gel capillary columns: BP-1 (polydimethylsiloxane, 50 m x 0.22 mm i.d., film thickness: 0.25 μ m) and BP-20 (polyethyleneglycol, 50 m x 0.22 mm i.d.). The oven temperature was programmed from 60 to 220 °C at a rate of 2 °C/min and then held isothermal for 20

minat 220 °C, with injector temperature of 250 °C, detector temperature of 250 °C, carrier gas: hydrogen (0.8 mL/min), and split ratio 1/60. The relative proportions of the oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalization, without using correcting factors. RIs were determined relative to the retention times of a *n*-alkanes series with linear interpolation ("Target Compounds" software, Perkin Elmer).

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

The EO's were analyzed with a Perkin Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL, equipped with a fused silica gel capillary column (BP-1 polydimethylsiloxane, 50 m, 0.22 mm id, film thickness 0.25 µm). Carrier gas: helium (at 1.0 mL/min); split ratio, 1/80; injection volume, 0.2 µL; injector temperature; 250 °C; oven temperature programmed from 60 to 230 °C at a rate of 2 °C/min and then held isothermal for 20 min at 220 °C; ion source temperature of 250 °C; ionization energy 70 eV.

Nuclear magnetic resonance

¹³C-NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.63 MHz for ¹³C, equipped with a 5 mm probe, in CDCl₃, with all shifts referred to internal TMS standard. The following parameters were used: pulse width = 4 µs (flip angle 45°); acquisition time = 2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 25000 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution = 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each sample (40 mg of essential oil in 0.5 mL of CDCl₃).

Identification of individual components

Identification of the individual components was carried out by: (i) comparison of their GC retention indices (RI) on polar and non-polar columns with those of reference compounds compiled in a laboratory-built library and with literature data (27); (ii) on computer matching against commercial mass spectral libraries (27-29); (iii) on comparison of the signals in the ¹³C-NMR spectra of the samples with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software (30-32).

Antioxidant activities

Reducing power

In this assay, 1 mL of EO or α -tocopherol in ethanol was mixed with sodium phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of 1% solution of $K_3Fe(CN)_6$. After 20 min of incubation at 50 °C, 2.5 mL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture and centrifuged at 3000×g for 10 min. 2.5 mL of supernatants were mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of 0.1% $FeCl_3$. The absorbance was measured at 700 nm. Increased absorbance of the mixture indicated increased reducing power (33).

Total antioxidant activity (TAT)

The total antioxidant activity of EO was evaluated by phosphomolybdenum method which is based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) (34). 400 μ L of EO in ethanol was added to 4 mL of reagents solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The mixture was incubated for 90 min at 95 °C and the absorbance was measured at 695 nm against blank (400 μ L of ethanol and 4 mL of reagents solution). The antioxidant capacity was expressed as equivalent of ascorbic acid (mg AAE/g of EO).

DPPH• activity

For the DPPH free radical scavenging activity, 20 μ L of each EO (1-100 mg/mL) or standards (α -tocopherol and pure compounds of EO used as positive controls) in ethanol was mixed separately with 180 μ L of ethanol solution of 100 mM DPPH in a 96-well microplate. After incubation in the dark for 30 min at 37 °C, the absorbance of the mixture and control (containing DPPH solution and ethanol) was measured at 515 nm against ethanol blank (35). The percentage of DPPH free radical scavenging activity was calculated from $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$, where A_{control} is the absorbance of the control and A_{sample} is the absorbance in the presence of a tested sample (EOs or standards). The results were expressed by the concentration required to scavenge 50% of DPPH• (IC_{50}), calculated from graph plotting inhibition percentage against EO concentrations.

ABTS•+ activity

The ABTS•+ solution (bluish-green color) was prepared by reacting at room temperature for 16 hours in the dark of 7 mM of ABTS salt with 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) (36). The obtained solution was diluted with ethanol up to absorbance value of 0.750 ± 0.025 at 734 nm. To 180 μ L of ABTS•+ diluted solution in a 96-well microplate, 20 μ L of each EO (1-100 mg/mL) or standards (α -tocopherol and pure compounds of EO used as positive controls) in ethanol were separately added. After incubation in the dark for 6 min at room temperature, the absorbance of the mixture and control (containing ABTS•+ solution and ethanol) was measured at 734 nm against ethanol blank. The percentage of ABTS•+ inhibition was calculated from $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$, where A_{control} is the absorbance of the control and A_{sample} is the absorbance in the presence of tested sample (EOs and

standards). The results were expressed by the concentration required to scavenge 50% of DPPH• (IC₅₀), calculated from graph plotting inhibition percentage against EO concentrations.

β-carotene bleaching activity

In this assay, a stock solution of β-carotene–linoleic acid mixture was prepared by mixing 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 20 in 3 mL of β-carotene solution (5 mg/50 mL chloroform). The chloroform was completely evaporated and 100 mL of oxygenated distilled water was added to the dry mixture and agitated vigorously. Freshly obtained emulsion (3 mL) was mixed with (100 μL) of EO or α-tocopherol (1–5 mg/mL dissolved in EtOH) were added. The absorbance at 470 and 700 nm was taken immediately and after 60 min of incubation at 50 °C against blank (37). The control (containing all reagents without the tested sample) was prepared in the same conditions. The degradation rate of β-carotene (DR) was calculated from $DR = A_{0min} - A_{60min}$, where A_{0min} is the initial absorbance at time 0 and A_{60min} is the absorbance at 60 minutes. The antioxidant activity (% AA) was calculated by the following formula: $AA\% = (DR_{control} - DR_{sample} / DR_{control}) \times 100$. The results expressed by IC₅₀, which represents the concentration required to obtain 50% of degradation rate of β-carotene.

Acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase inhibitory activity

AChE/BChE inhibitory activity measurements were carried out by a slightly modified Ellman assay as described before for AChE inhibitory activity. A typical run consisted of 180 μL of phosphate buffer (0.1 M, pH 8), 10 μL of DTNB (at a final concentration of 0.3 mM prepared in 0.1 M phosphate buffer pH 7 with 0.12 M sodium bicarbonate added for stability), 10 μL of sample solution (dissolved in 80% EtOH), and 10 μL of AChE/BChE solution (with final concentration 0.03 U/mL). Reactants were mixed in a 96-well plate wells and reaction was initiated by adding 10 μL of acetylthiocholine iodide/butyrylthiocholine iodide (ATChI/BTChI, to reach a final concentration of 0.5 mM). As a negative control, 80% EtOH was used instead of sample solution. Non-enzymatic hydrolysis was also monitored by measurement of two blank runs for each run. In short: in the first blank, the AChE/BChE, respectively, was replaced by equivalent buffer amount and in second blank, the ATChI/BTChI, respectively, was replaced by equivalent buffer amount. All spectrophotometric measurements were performed at 405 nm and at room temperature for 6 min periods using Synergy HTX S1LFA multi-mode microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT). The results are expressed as percentage inhibition of enzyme activity or IC₅₀ - where possible and compared to standard (tacrine) (38).

Statistical analysis

Antioxidant activities were conducted in triplicates and results are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). All data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and means were compared by least significant difference (LSD) using statistical software (XLStat 2016 Version 17.06). Differences at $p \leq 0.05$ were considered to be significant.

Results and Discussion

Chemical Composition

In this study, three different EO samples (needles, twigs and cones) from *A. numidica* were obtained by water distillation and analysed by GC-MS. The needles, twigs, and cones of *A. numidica* yielded 0.36, 0.45, and 0.39% (w/w) of EO, respectively. **Table 1** reports components identified by GC-MS listed in order of their elution, along with their retention indices on both capillary columns used. Additional data were compiled in **Figures (1, 2)**. The results of the analysis revealed fifty, thirty-eight and forty-nine, components in the EOs from needles, twigs, and cones representing 86.0%, 93.8%, and 93.4% of the total EO, respectively. The composition of needle, twig and cone EOs differ both qualitatively and quantitatively. Both monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons were more abundant than their oxygenated derivatives. Major components are similar in plant part EOs belonging to monoterpene hydrocarbons and differ mainly in their percent composition. Indeed, EOs are represented essentially by α -pinene (59.7, 25.3 and 17.6 % in twigs, cones and needles, respectively), limonene (40.7% cones, 10.0% twigs), β -pinene (12.9% twigs, 6.8% needles and 5.6% cones) and camphene (10.9% needles). In total only seven components are represented with a content higher than 5%: α -pinene (max. in twigs: 59.7%); limonene (max. in cones: 40.7%); β -pinene (max. in twigs: 12.9%); camphene (max. in needles: 10.9%); (*E*)- β -caryophyllene (max. in needles: 6.5%); himachala-2,4-diene (max. in needles: 5.9%) and δ -cadinene (max. in needles: 5.0%) (**Figure 1**). These discriminant components of EOs are qualitatively comparable to those reported by Ramdani et al. (11) on the same species collected from the same locality (natural populations of Babors mountains). As reported, the analysed EO of needles was dominated by α -pinene (22.6%), limonene (19.7%), β -pinene (12.3%), camphene (11.2%) and β -phellandrene (7.8%). In contrast only a small amount of limonene (2.1%) was identified in our sample. Bağcı & Babaç (50) demonstrated that the major compounds can be the same but with some quantitative differences in various studied *Abies* subspecies growing in Turkey. It is worth noting that bornyl acetate is found in various conifer oils (51). Moreover, bornyl acetate has been previously reported as one of the major constituents of EOs of various *Abies* species such as *A. alba* (7), *A. sachalinensis* (52), *A. sibirica* (53), *A. arnoldiana* (54), *A. koreana* (55-56). In the study of Gerling et al. (53) on *A. sibirica*, bornyl acetate was the most valuable component representing 29.4% followed by camphene (28.8%), α -pinene (10.8%) and 5-3-carene (6.2%). Although the compound was produced in a relatively smaller amount in *A. numidica*, terpene composition pattern seems to be similar with other *Abies* species. This phenomenon of qualitatively relative constant major components in several *Abies* species was reported by various authors. More specifically, it was found that some monoterpenes such as limonene, α -pinene, camphene, β -phellandrene and β -pinene are the most discriminant compounds within *Abies* species (57). Interestingly, variations in chemical composition and total percentages of these components should be

considered when discussing chemodiversity. Indeed, for the same species, significant differences in the content of EO may occur depending on various factors such as pedoclimatic conditions. To illustrate this, Gerling et al. (53) reported a consistency on the average monthly yield of the identified EOs of *Abies sibirica* however the qualitative composition of EO varied throughout the year. Neubeller (58) reported β -pinene, α -pinene and limonene as major constituents in EOs of *A. alba* and *A. numidica*. Although, there is a close genetic relationship between *A. alba* and *A. numidica* (59), it is not pertinent at this stage to consider these data as chemotaxonomic indicators to suggest any relative similarities. Conversely, in analysis of *A. alba* needle by Zeneli et al. (60): α -pinene, camphene, β -pinene, limonene and bornyl acetate were the major components. As it could be seen for *A. alba*, moving toward different habitats resulted in significant variation of amounts of EO major constituents.

Antioxidant activities

In vitro chemical-based methods such as reducing power, TAT, DPPH•, ABTS•+, and β -carotene bleaching assay have been developed to test the antioxidant activity of EOs (61-63). These assays are used to evaluate the ability of EOs to scavenge free radicals, reduce oxidized compounds, and inhibit lipid peroxidation. The antioxidant activity of EOs is assessed by measuring their ability to donate electrons or hydrogen atoms to stabilize free radicals and prevent oxidative damage (64-67). Results of the antioxidant activities of *A. numidica* EOs are summarized in the **Figure 3**.

Lee and Shibamoto (68) emphasized the importance of developing reliable assays for accurately measuring the antioxidant activity of natural antioxidants. They noted that antioxidant behavior is often more complex in hydrophilic systems compared to lipophilic systems. Therefore, lipophilic systems may provide a more accurate assessment of the antioxidant activity of non-polar or less-polar compounds. The reducing power activity worked well for both lipophilic and hydrophilic antioxidants (69). This method based on the reduction of Fe (III) to Fe (II) (the yellow potassium ferrocyanide-Fe³⁺ to Prussian blue potassium ferricyanide-Fe²⁺) (67). All the examined EO exhibited activity at concentrations exceeding 1 mg/mL, which was notably lower than the 0.25 mg/mL concentration of α -tocopherol, except for the EO derived from twigs at 5 mg/mL (see **Figure 3.A**). This difference was statistically significant ($p < 0.05$), except for the concentrations of 0.25 and 0.5 mg/mL, where none of EOs exhibited any activity. The EO-needle showed higher activity than EO-twigs and EO-

cones at 1 and 2 mg/mL. At concentrations of 3-5 mg/mL, EO-twigs shows highest activity followed by EO-needles and EO-cones, respectively.

The spectrophotometric quantification of antioxidant capacity by the phosphomolybdenum method (TAT) has been considered as a good alternative for the determination of vitamin E in a variety of lipophilic samples (34). In the presence of antioxidants, the molybdenum (VI) is reduced to the molybdenum (V) by electron or hydrogen atom transfer (64). In this particular method, **Figure 3.B** illustrates a positive linear regression for all parts of the tested EOs. Notably, EO-cones exhibited higher activity compared to EO-needles and EO-twigs within the concentration range of 0.03125-0.125 mg/mL, with a statistically significant difference ($p < 0.05$), except for the comparison between EO-twigs and EO-cones at 0.125 mg/mL. At concentrations ranging from 0.125 to 0.50 mg/mL, EO-twigs displayed the highest activity, followed by EO-cones and EO-needles, in that order, with a statistically significant difference ($p < 0.05$). Furthermore, at 0.5 mg/mL, EO-twigs exhibited higher activity than ascorbic acid at 0.25 mg/mL, whereas both EO-cones and EO-needles at 0.5 mg/mL demonstrated higher activity than ascorbic acid at 0.2 mg/mL.

For the DPPH test, the radical (DPPH•) is neutralised by an antioxidant by accepting a hydrogen atom or an electron, giving a reduced form (DPPH or DPPH-H) (64). The IC_{50} results (**Figure 3.C**) demonstrate the radical-scavenging activity of the substances tested. Among them, α -tocopherol exhibited the most potent activity with an IC_{50} value of 0.142 ± 0.003 mg/mL, followed by β -caryophyllene at 3.338 ± 0.123 mg/mL. The EO-cones showed moderate activity with an IC_{50} value of 5.394 ± 0.696 mg/mL, while carvone and β -pinene displayed slightly weaker activity at 6.734 ± 0.177 mg/mL and 7.523 ± 0.209 mg/mL, respectively. In contrast, EO-needles had a notably higher IC_{50} value of 44.860 ± 0.143 mg/mL, indicating weaker radical-scavenging potential. Caryophyllene oxide and EO-twigs demonstrated even higher IC_{50} values, at 62.895 ± 1.923 mg/mL and 72.124 ± 1.323 mg/mL, respectively. These results, depicted in **Figure 3.C**, highlight the varying degrees of radical-scavenging activity among the tested compounds, with α -tocopherol standing out as the most potent antioxidant in this context.

In the ABTS test, the initially unstable blue-green radical (ABTS•+) undergoes electron acceptance when exposed to antioxidants, resulting in the formation of a stable ABTS form with a pale blue color. This reaction has been documented in studies by Bibi Sadeer et al. (64), Ivanova et al. (65), Platzer et al. (66) and Munteanu and Apetre (67). The results obtained (**Figure 3.D**) reveal significant radical-scavenging activity, as indicated by the IC_{50} values: α -tocopherol displayed the most potent activity at

0.039±0.002mg/mL, followed by EO-cones at 2.150±0.274mg/mL, and β -caryophyllene at 4.237±0.093 mg/mL. Carvone and β -pinene exhibited slightly weaker but still noteworthy activity, with IC₅₀ values of 4.768 ± 0.229 mg/mL and 25.507 ± 0.189 mg/mL, respectively. EO-needles, EO-twigs, and caryophyllene oxide displayed higher IC₅₀ values of 33.563 ± 0.426 mg/mL, 50.120 ± 0.097 mg/mL, and 54.988±1.752mg/mL, respectively. As illustrated in **Figure 3.D**, these findings highlight differing levels of radical-scavenging activity among the tested substances, with α -tocopherol emerging as the most potent antioxidant.

For the β -carotene bleaching test, the mechanism is based on the protection of β -carotene by antioxidants against the free radicals generated by the oxidation of linoleic acid in the emulsion (65). For this test (**Figure 3.E**), α -tocopherol exhibited the most potent activity with an IC₅₀ value of 0.500 ± 0.015 mg/mL, indicating its exceptional ability to protect β -carotene from oxidation. EO-needles also displayed notable antioxidant potential, with an IC₅₀ value of 1.421 ± 0.265 mg/mL, demonstrating its capacity to delay the bleaching of β -carotene. In comparison, EO-twigs and EO-cones exhibited slightly weaker but still significant β -carotene bleaching activity, with IC₅₀ values of 3.624±0.232mg/mL and 9.328±0.333mg/mL, respectively. These findings, as reported in **Figure 3.E**, showing varying degrees of protection against β -carotene oxidation, with α -tocopherol emerging as the most potent antioxidant.

The results of the DPPH• and ABTS•+ assays exhibited a noteworthy similarity, in agreement with similar radical mechanism of action. This concurrence is in line with findings from a prior investigation, where it was observed that limonene displayed strong activity in the DPPH• system, registering at 93.1%, while manifesting milder activity in the ABTS•+ system, at 12.4%. In contrast, β -pinene demonstrated moderate activity in the DPPH• system, measuring at 21.4%, but displayed lower activity in the ABTS•+ system, at 8.8%. Meanwhile, α -pinene exhibited minimal activity in both systems, as reported in the study by Yang et al. (7).

Similarly, in this study, the strong activity in the DPPH• system and limited activity in the ABTS•+ system observed for EO-cones and EO-twigs can be attributed to the substantial presence of limonene in EO-cones (40.7%) and the notable content of α -pinene in EO-twigs (59.7%). Furthermore, β -caryophyllene exhibited superior activity compared to carvone and β -pinene in both the DPPH• and ABTS•+ systems, as evidenced in **Figure 3.C** and **D**. This enhanced activity can be linked to the moderate activity of EO-needles (containing 6.5% of carvone), which aligns with the presence of β -caryophyllene in EO-needles. The statistical analysis using ANOVA ($p < 0.05$) on these results indicates a noteworthy and significant difference among all the EOs derived from different parts of *A. numidica*, as well as the utilized standards, as depicted in **Figure 3.C, D**, and **E**. Within the DPPH• system, EO-cones displayed higher activity compared to carvone, β -pinene, EO-needles, caryophyllene oxide, and EO-twigs. Similarly, in the ABTS•+ system, EO-cones exhibited higher activity than EO-needles, EO-twigs, and all the standards used, except for α -tocopherol. However, in the β -carotene bleaching system, EO-cones displayed lower activity than EO-needles, EO-twigs, and α -tocopherol. These variations in

activity can be attributed to the solubility characteristics of the EO compounds within the respective reaction systems. Indeed, it has been reported that ABTS^{•+} (70) and DPPH[•] system (71) is appropriate in the investigation of hydrophilic and lipophilic antioxidants unlike to β -carotene bleaching system, which is recommended for lipophilic antioxidants (72). In the present study, the β -carotene bleaching has shown a high sensitivity and affinity for lipophilic antioxidants, followed by ABTS^{•+} and last by DPPH[•] system, confirming the results of our previous study on *Pinus nigra* ssp. *mauretanica* (73). The relatively important antioxidant activity observed in EO-cones within the ABTS^{•+} and DPPH[•] systems may be attributed to its notable content of oxygenated compounds (15.7%). These compounds tend to exhibit greater solubility in these particular systems compared to the β -carotene bleaching system, where the compounds found in EO-needles and EO-twigs have higher solubility. In fact, it has been reported that solubility of the compounds in different antioxidant activity system can modify the ability of the EO to reduce many radicals (74). Comparatively, EO-needles are most active at 1 and 2 mg/mL in the reducing power test, while EO-twigs excel at 3-5 mg/mL. In the phosphomolybdenum method, EO-cones are most active at 0.03125-0.125 mg/mL, while EO-twigs lead at 0.125-0.50 mg/mL. For ABTS^{•+} and DPPH[•], EO-cones are the most active, while EO-twigs are the least active. Conversely, in the β -carotene bleaching system, EO-needles are the most active, with EO-twigs next, and EO-cones being the least active.

In summary, the antioxidant potential of EOs mainly depends on their chemical content (75) and is directly related to oxygenated terpenes (76), particularly terpenoids with phenolic groups such as carvacrol, methyl chavicol, thymol, and eugenol (77). It has been also reported that monoterpene hydrocarbons may be considered as active antioxidants but with less activity than oxygenated monoterpenes. Whereas, sesquiterpene hydrocarbons and their oxygenated derivatives show very low antioxidant activity (78). Moreover, other components such as certain alcohols, ethers, ketones and aldehydes also play a key role in the antioxidant capacities of EOs (75). Furthermore, depending on the experimental conditions and the composition of the EO, an antagonistic or synergistic effect may occur between the compounds (79).

In conclusion, EO extracted from different parts of the *A. numidica* plant exhibited varying antioxidant activities across different assays. EO-needles excel in protecting against lipid peroxidation, EO-twigs demonstrate versatile antioxidant potential, and EO-cones are effective in scavenging free radicals. The choice of the most valuable part will depend on the specific targeted application. These differences emphasize the importance of understanding the unique chemical compositions of EOs extracted from various plant parts, as they can lead to different antioxidant behaviors in different assays and systems.

AChE and BChE inhibitory activities

Particular attention was paid to this activity, as it is relevant to the treatment of Alzheimer's disease (AD). Some acetylcholinesterase inhibitors occur naturally in plants. For instance, Galantamine, an alkaloid from the Amaryllidaceae family, has been shown to be effective against AD, and its treatment has also been shown to be safe (80). Numerous studies have highlighted the role of EOs as acetylcholinesterase inhibitors, with some oils demonstrating notable potential (81-85). This has led to significant efforts to identify and isolate individual compounds within specific oils that retain substantial activity (86, 84). Regarding our plant, All EOs showed strong inhibitory activity against AChE with percentages above 50%: EO-twigs (93.89%), EO-needles (77.88%) and EO-cones (69.15%), at the maximum concentration tested (45 µg/mL). The concentrations required for these EOs to reach 50% enzyme inhibition (IC₅₀) were: 2.73 µg/mL (EO-twigs), 4.09 µg/mL (EO-needles) and 13.64 µg/mL (EO-cones), which is comparable (in case of EO-twigs) but still lower than the standard used, tacrine (IC₅₀ = 1.21 µg/mL). All the tested EOs showed lower inhibitory potential with respect to BChE, compared to AChE and tacrine at the highest concentration tested (45 µg/mL), as follows: EO-cones = 33.23%, EO-needles = 26.47% and EO-twigs = 19.10 %.

In several studies, EOs tested generally showed lower inhibitory potential against BChE compared to AChE (87, 85). The anticholinesterase activity of EOs is attributed to their major constituents, such as camphor and 1,8-cineole (85). However, the overall inhibitory activity of EOs is often more potent than that of their major constituents alone (85). Various plant sources, including *Salvia lavandulaefolia*, *Rumex hastatus*, and *Thymus spathulifolius*, *Myrtus communis* have been investigated for their potential as natural inhibitors of AChE and BChE (87, 88, 85, 89).

The good AChE inhibitory potential of the tested EOs might be related to α -pinene, β -pinene, and limonene, which have a good inhibitory effect on acetylcholinesterase (85, 84). α -pinene from EO of *Salvia lavandulifolia* showed non-competitive reversible inhibition of AChE (85).

Some minor EO constituents of the tested EOs may also have had synergistic or antagonistic effects on the ChE inhibitory potential of the tested EOs. These findings suggest that our EOs and their constituents have the potential to be explored as natural treatments for conditions related to cholinesterase dysfunction, such as AD.

Conclusion

The present study reported the EO composition of the needles, twigs and cones of an endemic tree from Algeria: *A. numidica* for the first time. A total of 81 constituents were identified while major constituents were α -pinene (17.6-59.7%), limonene (2.1-40.7%), β -pinene (5.6-12.9%) and camphene (0.4-10.9%). Analyzed EOs were dominated by the presence of monoterpene hydrocarbons (46.3-86.0%) followed by sesquiterpene hydrocarbons (2.6-33.6%). Repeating terpene constituent patterns in *Abies* taxa reinforces the idea that relationships can be found between botanical characteristics and chemical composition of closely related species leading thus to stimulate chemosystematic debates for a better understanding of evolutionary phenomenon. Tested EOs revealed various degrees of antioxidant activities depending on the test type. Compared to needles and twigs, EO of cones was found to have the highest antioxidant activity for most of the tests performed (FRAP, ABTS $\bullet$ and DPPH $\bullet$). Tested EOs exhibited more selective inhibitory activity towards AChE with lower activity towards BChE. Twigs were found the most active AChE inhibitors ($IC_{50}=2.73\mu g/mL$) followed by needles ($IC_{50}=4.09\mu g/mL$), while lowest potency was recorded for cones ($IC_{50}=13.64\mu g/mL$). All these results are evoking potential therapeutic benefits of *A. numidica* EOs by making it an appropriate candidate for further studies and identification of its bioactive principles with particular emphasis in the research for the treatment of Alzheimer's disease and other related dementias.

Table1:Chemicalcompositionofneedles,twigsandconesessentialoilsofAbiesnumidicaessentialoilfromAlgeria

N°	Compound	Ria	RIa(lit)	Rip	RIp (lit)	Class	Content(%)			Identificationmode
							NEO	TEO	CEO	
01	Santene	878	884	979	984 ^a	MH	1.8	0.1	tr	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
02	Tricyclene	921	927	1015	1012	MH	1.8	0.2	tr	GC-RI,GC-MS
03	α -Thujene	924	932	1015	1026	MH	0.1	0.1	tr	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
04	α -Pinene	932	936	1015	1025	MH	17.6	59.7	25.3	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
05	α -Fenchene	941	941	1054	1061	MH	-	-	tr	GC-RI,GC-MS
06	Camphene	945	950	1065	1068	MH	10.9	1.0	0.4	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
07	Thuja-2,4(10)-diene	946	945	1126	1122	MH	-	0.3	0.8	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
08	Heptan-1-ol	955	959 ^b	1445	1452	Other	-	-	0.0	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
09	Sabinene	966	973	1122	1122	MH	0.1	0.4	0.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
10	β -Pinene	971	978	1111	1110	MH	6.8	12,9	5.6	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
11	Myrcene	982	987	1160	1161	MH	0.3	0.6	0.9	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
12	α -Phellandrene	998	1002	1165	1168	MH	tr	-	-	GC-RI,GC-MS
13	<i>p</i> -Cymene	1011	1015	1271	1270	MH	0.1	0.2	0.4	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
14	Limonene*	1021	1025	1203	1198	MH	2.1	10.0	40.7	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
15	β -Phellandrene*	1021	1023	1210	1209	MH	4.5	0.4	0.3	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR

16	<i>p</i> -Cymenene	1072	1075	1437	1437	MH	-	0.1	0.4	GC-RI,GC-MS
17	Terpinolene	1079	1082	1282	1282	MH	0.2	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
18	Nonanal	1082	1083	1393	1391	other	0.1	0.1	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
19	Linalool	1084	1086	1546	1543	MO	0.2	-	-	GC-RI,GC-MS
20	Fenchol	1098	1099 ^c	1580	1582 ^c	MO	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
21	α -Campholenal	1105	1106	1488	1496	MO	0.1	0.3	1.0	GC-RI,GC-MS
22	Nopinone	1106	1108 ^d	1577	1577 ^d	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
23	<i>cis</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	1115	1117	1660	1652	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
24	Camphor	1119	1125	1515	1515	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
25	<i>trans</i> -Pinocarveol	1122	1126	1652	1661	MO	-	0.5	2.7	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
26	<i>trans</i> -Verbenol	1127	1136	1675	1680	MO	-	0.1	0.7	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
27	Pinocarvone	1137	1137	1567	1575	MO	-	0.3	1.3	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
28	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1144	1127	1724	1674	MO	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
29	Borneol	1157	1150	1697	1699	MO	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS
30	Terpinen-4-ol	1158	1164	1591	1601	MO	0.2	-	0.5	GC-RI,GC-MS
31	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1160	1159 ^e	1794	1848	MO	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS
32	Myrtenal	1168	1172	1626	1631	MO	-	0.3	1.3	GC-RI,GC-MS
33	α -Terpineol	1172	1176	1693	1694	MO	0.2	0.1	1.0	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR

34	Myrtenol	1177	1178	1788	1790	MO	-	0.1	0.8	GC-RI, ¹³ C-NMR
35	Verbenone	1179	1183	1705	1720	MO	-	0.1	3.0	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
36	<i>trans</i> -Carveol	1196	1200	1832	1836	MO	-	0.1	0.9	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
37	<i>cis</i> -Carveol	1207	1210	1862	1854	MO	-	-	0.3	RI, ¹³ C-NMR
38	Carvone	1213	1214	1732	1733	MO	-	0.1	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
39	Carvotanacetone	1218	1220	1684	1687	MO	-	-	tr	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
40	Linalylacetate	1240	1236 ^a	1555	1551	MO	0.2	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
41	Perillaldehyde	1247	1242 ^f	1783	1779 ^f	MO	-	-	tr	GC-RI, ¹³ C-NMR
42	Phellandral	1249	1252 ^g	1712	1715 ^g	MO	-	-	tr	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
43	Bornylacetate	1268	1268 ^c	1577	1573 ^c	MO	0.2	-	0.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
44	Carvacrol	1278	1278	2221	2210	MO	-	-	tr	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
45	<i>a</i> -Terpinylacetate	1332	1335	1693	1694	MO	0.1	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
46	Citronellylacetate	1334	1337	1659	1656	MO	0.1	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
47	<i>a</i> -Cubebene	1347	1355	1454	1460	SH	0.4	0.1	-	GC-RI,GC-MS
48	<i>a</i> -Longipinene	1350	1360	1479	1469	SH	2.4	0.5	0.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
49	Longicyclene	1375	1382	1488	1489	SH	0.5	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
50	<i>b</i> -Bourbonene	1382	1386	1515	1523	SH	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS
51	Longifolene	1404	1411	1563	1577	SH	1.6	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR

52	b-Longipinene	1415	1403	n.i.	n.i.	SH	-	-	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
53	(E)-β-Caryophyllene	1417	1421	1592	1598	SH	6.5	1.0	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
54	Himachala-2,4-diene	1421	1430 ^h	1598	1611 ^h	SH	5.9	0.6	0.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
55	b-Copaene	1426	1430	1586	1579	SH	0.1	-	-	GC-RI,GC-MS
56	α-Himachalene	1445	1450	1636	1663	SH	1.1	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
57	α-Humulene	1449	1455	1664	1667	SH	2.2	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
58	(E)-b-Farnesene	1457	1446	1666	1664	SH	0.2	-	-	GC-RI,GC-MS
59	g-Muurolene	1463	1474	1682	1690	SH	0.8	0.4	0.3	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
60	g-Himachalene	1469	1479	1702	1708	SH	0.6	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
61	GermacreneD	1476	1479	1709	1708	SH	-	0.2	1.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
62	g-Humulene	1485	1483	1724	1716 ^a	SH	0.8	-	0.1	GC-RI, ¹³ C-NMR
63	α-Muurolene	1490	1496	1721	1723	SH	0.2	-	-	GC-RI,GC-MS
64	d-Selinene	1491	1490	n.i.	1728 ^z	SH	-	-	0.1	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
65	g-Cadinene	1504	1507	1750	1763	SH	1.2	0.6	0.2	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
66	b-Himachalene	1505	1500	1715	1723	SH	2.8	-	-	GC-RI,GC-MS
67	trans-Calamenene	1508	1517	1826	1823	SH	0.4	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
68	d-Cadinene	1514	1520	1751	1756	SH	5.0	0.9	0.3	GC-RI,GC-MS
69	ar-Himachalene	1522	1528	1715	n.i.	SH	0.4	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR

70	a -Calacorene	1527	1527	1908	1921	SH	0.1	-	-	GC-RI,GC-M
71	a -Cadinene	1529	1534	1785	1769	SH	0.1	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
72	b -Calacorene	1547	1541	1934	1940	SH	0.3	-	-	GC-RI,GC-M
73	Caryophylleneoxide	1568	1578	1975	1986	SO	0.8	0.4	-	GC-RI,GC-MS
74	Longiborneol	1583	1597	2057	2157	SO	0.8	0.2	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
75	HumuleneepoxideII	1592	1602	2036	2047	SO	0.2	0.1	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
76	τ -Cadinol	1624	1633	2162	2169 ^a	SO	1.2	-	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
77	t-Muurolol	1631	1628 ⁱ	2177	2179 ⁱ	SO	-	0.2	-	GC-RI,GC-MS, ¹³ C-NMR
78	Himachalol	1632	1647 ^j	2223	2135 ^j	SO	1.3	-	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
79	a -Cadinol	1636	1643	2223	2227	SO	0.4	-	-	GC-RI,MS, ¹³ C-NMR
80	Dehydroabietal	2030	2219 ^j	n.i.	n.i.	DO	-	0.3	-	GC-RI, ¹³ C-NMR
81	Abietadiene	2085	2071	2478	2450	DH	-	0.2	-	GC-RI,MS, ¹³ C-NMR

Components are listed following their order of elution on a polar column. Percentages measured on a polar column, except those with * (polar column);

RI_a, RI_p: Retention indices on a polar and non-polar column, respectively; RI_a(lit), RI_p(lit), literature retention indices;

MS, Mass Spectrometry; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; tr, traces ; n.i.: undefined (not identified) ; M.H : Monoterpene hydrocarbons ; M.O. : Oxygenated monoterpenes ; S.H. : Sesquiterpene hydrocarbons; S.O.: Oxygenated sesquiterpenes; D.H: Diterpene Hydrocarbons; D.O.: Oxygenated Diterpenes

The values of RI_a/RI_a(lit) and RI_p/RI_p(lit) prefixed by the letters (a-j) are obtained from the following literature (39-48; (≠)49 [Column type : Packed ; Active phase : Carbowax 20M ; Temperature (°C) : 165].

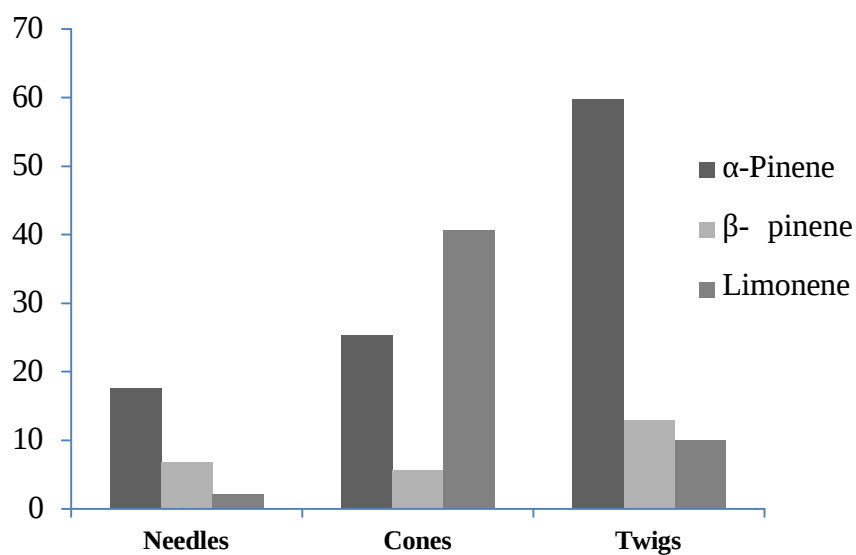


Figure1. Comparison of the top three major compounds from EOs from each plant part of *Abies numidica*.

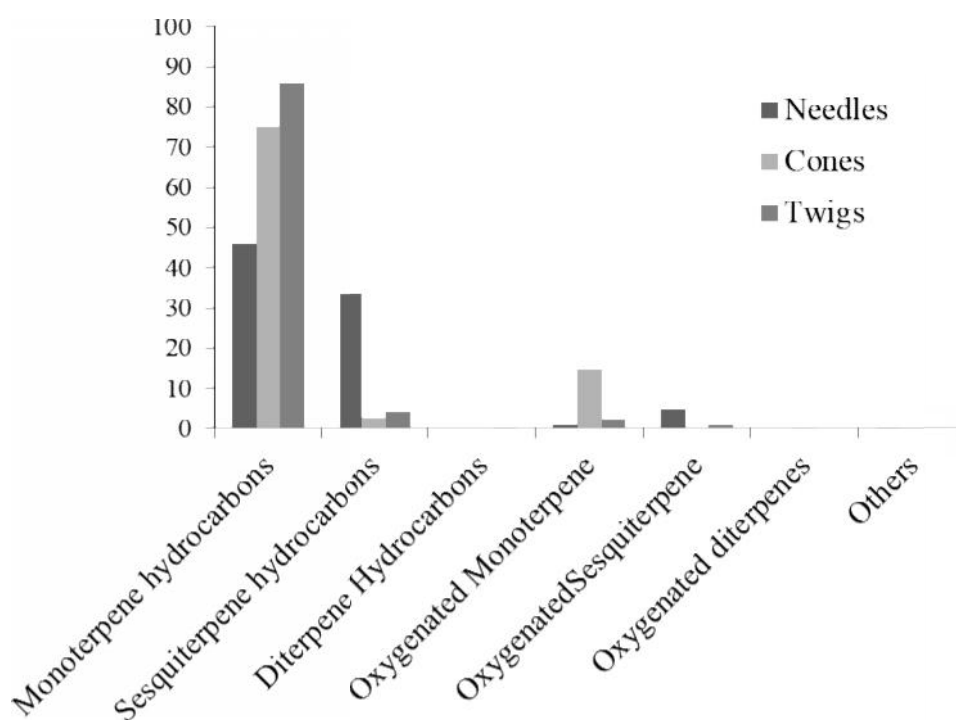
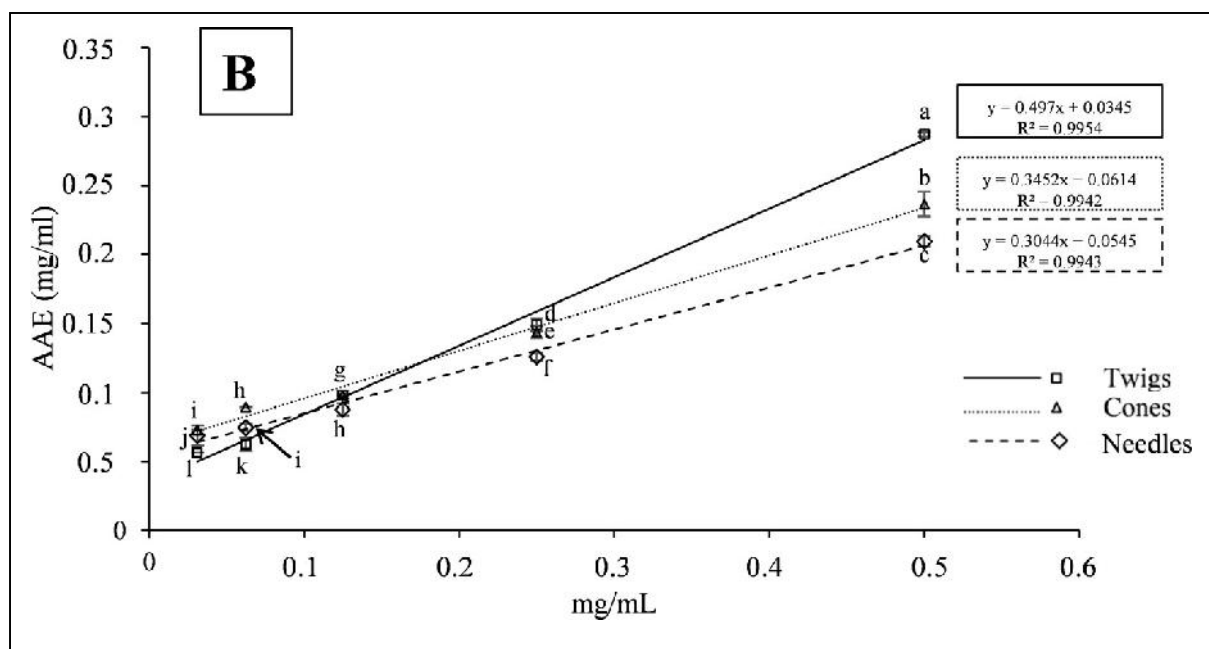
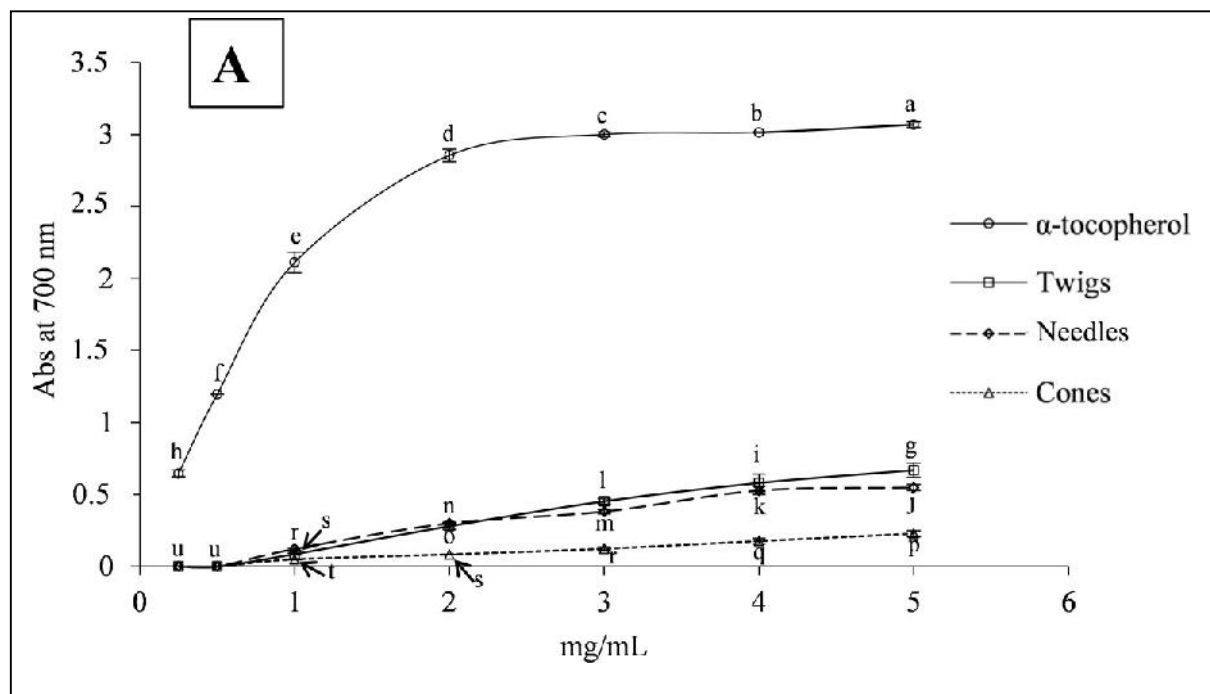
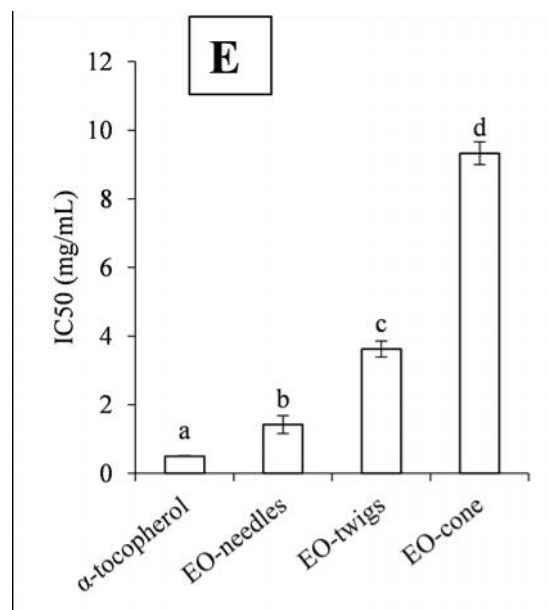
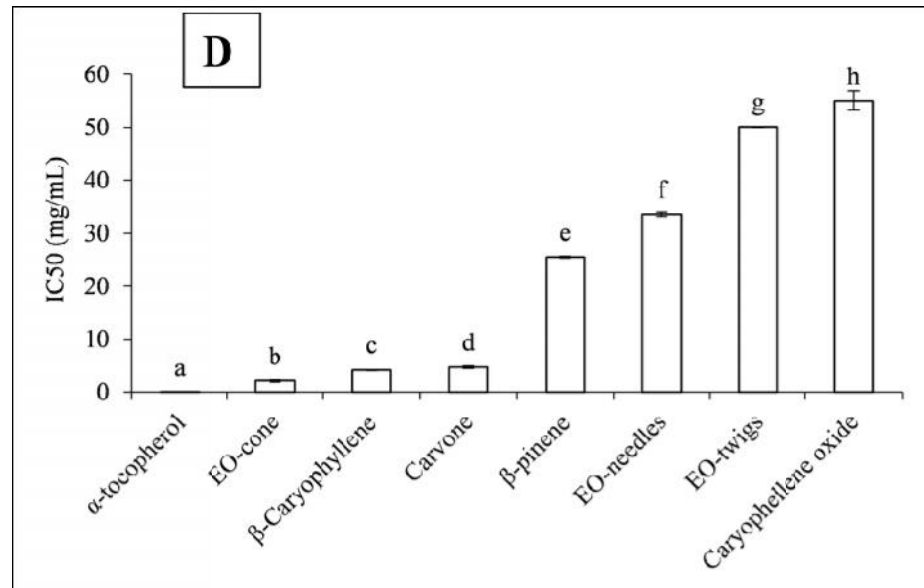
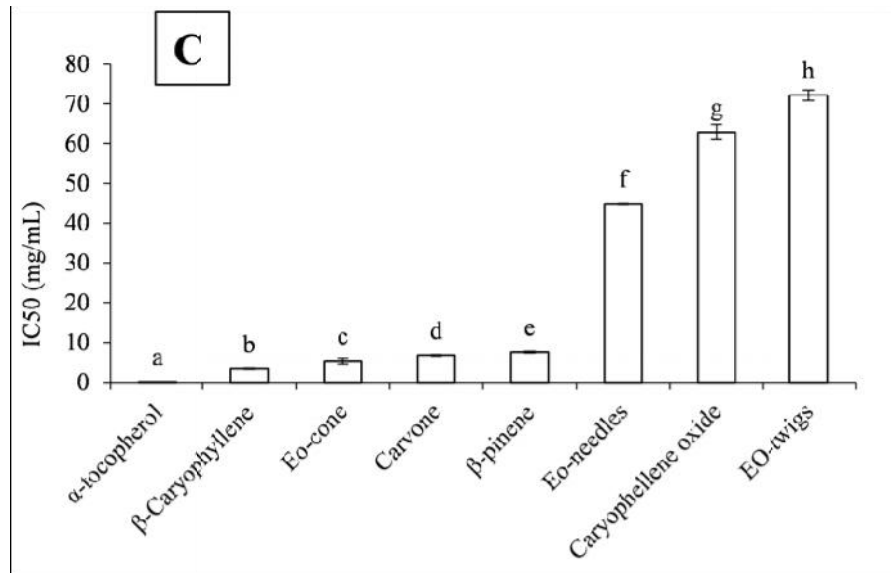


Figure2. Content of main compound classes in essential oils obtained from different parts of *Abies numidica*.

Figure 3. Antioxidant activities: (A) Reducing power, (B) Total antioxidant activity (TAT), (C) DPPH•activity,(D)ABTS•+activity and(E)β-carotenebleachingactivity.(a-u are notation of the level of statistical differences).





References

1. P. Quezel, *Lessapins du pourtour méditerranéen*. Forêt méditerranéenne. T. VII(1):27-34, 1985.
2. M. Illoul-Hachi, *Variabilité morpho-anatomique, diversité génétique, potentiel de régénération et efficacité de la production grainière du sapin de Numidie (Abies numidica de Lannoy) en plantation (cas de Serraidi) Annaba (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri)*, 130p, 2016.
3. E. Bağcı and M. Diğrak, *Antimicrobial activity of essential oils of some Abies (Fir) species from Turkey*. Flavour and Fragrance Journal, 11(4), 251-256, 1996.
4. A. Pichette, P. Luc Larouche, M. Lebrun and J. Legault, *Composition and Antibacterial Activity of Abies balsamea Essential Oil*. Phytotherapy Research, 20, 371–373, 2006.
5. X.W. Yang, H.W. Zeng, X.H. Liu, S.M. Li, W. Xu, Y.H. Shen, Ch. Zhang and W.D. Zhang, *Anti-inflammatory and anti-tumour effects of Abies georgei extracts*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 60(7), 937-941, 2008.
6. K. S. Dayisoğlu, A. D. Duman, M. H. Alma and M. Diğrak, *Antimicrobial activity of the essential oil of fir from cones of Abies cilicica subsp. cilicica*. African Journal of Biotechnology, 8(19), 5021– 5024, 2009.
7. S. A. Yang, S. K. Jeon, E. J. Lee, N. K. Im, K. H. Jhee, S. P. Lee and I. S. Lee, *Radical scavenging activity of the essential oil of silver fir (Abies alba)*. Journal of Clinical Biochemistry Nutrition, 44(3), 253– 259, 2009.
8. T. Satou, M. Matsuura, M. Takahashi, T. Umezū, S. Hayashi, K. Sadamoto and K. Koike, *Anxiolytic-like effect of essential oil extracted from Abies sachalinensis*. Flavour and Fragrance Journal, 26, 416– 420, 2011.
9. Y. Tlili-Ait Kaki, S. Bennadja and D. Abdelghani, *The Therapeutic Importance of Products Extracted from the Fir Tree of Numidia (Abies numidica) and Research on its Antibacterial Activity*. Journal of Forestry Faculty of Kastamonu University, 12(31), 2012.
10. Y. Tlili-Ait Kaki, S. Bennadja and A. Chefrou, *Revalorisation d'une essence endémique: Le sapin de Numidie (Abies numidica)*. Flora Mediterranea, 23, 123–129, 2013.
11. G. Ghadbane, R. Bounar, K. Rebbas, S. Medjekal, H. Belhadj, L. Benderradji, T. Smaili and D. Harzallah, *Antioxidant and antimicrobial activities of endemic tree Abies numidica growing in Babour mountains from Algeria*. Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine, 5(1), 19, 2016.
12. M. Ramdani, T. Lograda, P. Chalard and G. Figueredo, *Chemical and antimicrobial properties of essential oils of Abies numidica, endemic species of Algeria*. International Journal of Phytopharmacology, 5, 432-440, 2014.
13. O. Naili, D. Harzallah, Z. Belhamra, N. Chaabna, S. Gaamoune, H. Belhadj and S. Dahamna, *Effect of Abies numidica Extracts on Performance, Blood Parameters and Caecal Microflora of Broiler Chicks*. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences, 6(6), 1024-1029, 2015.
14. B. Poaty, J. Lahlah, F. Porqueres and H. Bouafif, *Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 31(6), 907–919, 2015.

15. A. Wajs- Bonikowska, M. Sienkiewicz, A. Stobiecka, A. Maciąg, L. Szoka and E. Karna, *Chemical composition and biological activity of Abies alba and A. koreana seed and cone essential oils and characterization of their seed hydrolates*. Chemistry & Biodiversity, 12(3), 407-418, 2015.
16. M. Belhadj-Mostefa, A. Abedini, L. Voutquenne-Nazabadioko, S. C. Gangloff, A. Kabouche and Z. Kabouche, *Abietane diterpenes from the cones of Abies numidica de Lannoy ex Carrière (Pinaceae) and in vitro evaluation of their antimicrobial properties*. Natural Product Research, 31(5), 568-571, 2017.
17. Z. Wang, L. A. Cáceres, M. M. Hossain, S. B. Abdallah, O. Ogbeide, Z. Yao, J. B. Renaud and I. M. Scott, *The antioxidant and enzyme inhibitory activity of balsam fir (Abies balsamea (L.) Mill.) bark solvent extracts and pyrolysis oil*. Waste and Biomass Valorization, 10(11), 3295-3306, 2019.
18. D. Benouchenne, I. Bellil, S. Akkal and D. Khelifi, *Investigation of phytochemical and evaluation of antioxidant and antibacterial activities from Abies extract*. Scientific Journal of King Faisal University: Basic and Applied Sciences, 22(2), 26-32, 2021.
19. Kolai L., *La sapinière d'Abies numidica dans le Mont Babor*. Annales de la Recherche Forrestière en Algérie, INRF, Bainem. pp. 85-97, 1990.
20. B. Fady, *Utiliser le sapin d'Algérie pour sauvegarder la forêt de sapin provençale*. Rapport scientifique final. [Contrat] INRA 21A02654, 2007. hal-02816144, 2007.
21. S. Bennadja and Y. Tlili-Ait Kaki, *the Fir of Numidia: a Threatened Kind*. Kastamonu University Journal of Forestry Faculty, 12(3), 283-286, 2012.
22. M. Illoul-Hachi, A. Derridj and B. Fady, *Efficiency of seed production and cone size of Abies numidica De Lannoy in the plantation in Algeria*. International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences, 3 (7), 9-16, 2015.
23. K. Sharma, *Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics*. Molecular Medicine Reports, 20(2), 1479-1487, 2019.
24. A. Hasan, Kh. M. Khan, M. Sher, G. M. Maharvi, S. A. Nawaz, M. I. Choudhary, A-Ur. Rahman and C. T. Supuran, *Synthesis and inhibitory potential towards acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and lipoxigenase of some variably substituted chalcones*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 20:1, 41-47. 2005.
25. S. Berkov, J. Bastida, M. Nikolova, F. Viladomat and C. Codina, *Rapid TLC/GC- MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts*. Phytochemical Analysis, 19, 5, 411-419. 2008.
26. L. S. D. Silva, C. A. Porfiro, F. G. Silva, A. R. D. S. Rodrigues and P. S. Pereira, *Acetylcholinesterase and α -Amylase inhibitors from Mouriri elliptica Martius leaf extract*. Bioscience Journal, Uberlândia, 36, 2, 578-590. 2020.
27. W. A. König, D. H. Hochmuth and D. Joulain, *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of Mass Finder 2.1*. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany (2001).
28. R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL (2007).

29. National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Perkin–Elmer Corp., Norwalk, CT (1999).
30. F. Tomi, P. Bradesi, A. Bighelli and J. Casanova, *Computer aided identification of individual components of essential oil using carbon –13 NMR spectroscopy*. Journal of Magnetic Resonance Analysis, 1, 25-34, 1995.
31. F. Tomi and J. Casanova, ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review. In “The Labiatae: advances in Production, Biotechnology and Utilisation” Eds: cervelli C, Ruffoni B, Dalla Guda C. Acta horticulturae, 723(723), 185-192, (2006).
32. O. Bazzali, T.H. Thai, T.M. Hoi, N.S. Khang, H.J. Nguyen Thi, C.A. Bighelli and F. Tomi, *Wood oil from Xanthocyparis vietnamensis Farjon et Hiep. Integrated analysis by chromatographic and spectroscopic techniques*. Molecules, 21(7), 840-851, 2016.
33. Q. Liu, H. Yao, *Antioxidant activities of barley seed extracts*. Food Chemistry, 102, 732-737, 2007.
34. P. Prieto, M. Pineda and M. Aguilar, *Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E*. Analytical Biochemistry, 269, 337-341, 1999.
35. N. Rangkadilok, S. Sitthimonchai, L. Worasuttayangkurn, C. Mahidol, M. Ruchirawat and J. Satayavivad, *Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract*. Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 45, 328-336, 2007.
36. V. Katalinić, M. Miloš, T. Kulišić, M. Jukić, *Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols*. Food Chemistry, 94, 550-557, 2006.
37. Y. Lim and E. Quah, *Antioxidant properties of different cultivars of Portulaca oleracea*. Food Chemistry, 103, 734-740, 2007.
38. F. Burčul, I. Generalić Mekinić, M. Radan, P. Rollin and I.B. lažević, *Isothiocyanates: Cholinesterase inhibiting, antioxidant, and anti-inflammatory activity*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 33(1), 577-582, 2018.
39. E. Duquesnoy, V. Castola and J. Casanova, *Composition and chemical variability of the twig oil of Abies alba Miller from Corsica*. Flavour and Fragrance Journal, 22(4), 293-299, 2007.
40. V.I. Babushok, P.J. Linstrom, I.G. Zenkevich, *Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 40 (4), 043101-47, 2011.
41. E. Duquesnoy, N.H. Dinh, V. Castola and J. Casanova, *Composition of a Pyrolytic oil from Cupressus funebris Endl. of Vietnamese origin*. Flavour and Fragrance Journal, 21, 3, 453-457, 2006.
42. L. Bousmaha, J.B. Boti, F.A. Bekkara, V. Castola and J. Casanova, *Intraspecific chemical variability of the essential oil of Lavandula dentata L. from Algeria*. Flavour and Fragrance Journal, 21, 2, 368-372, 2006.
43. M.C. Blanc, P. Bradesi, M.J. Goncalves, L. Salgueiro, J. Casanova, *Essential oil of Dittrichia viscosa ssp. viscosa: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity*. Flavour and Fragrance Journal, 21, 2, 324- 332, 2006.

44. J.B. Boti, A. Muselli, F.Tomi, G. Koukoua, T.Y. N'Guessan, J. Costa and J. Casanova, *Combined analysis of Cymbopogon giganteus Chiov. leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR*. Comptes Rendus Chimie, 9, 1, 164-168, 2006.
45. M. Gonny, C. Cavaleiro, L. Salgueiro and J. Casanova, *Analysis of Juniperus communis subsp. alpina needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and ¹³C- NMR*. Flavour and Fragrance Journal, 21(1), 99-106, 2006.
46. E.Duquesnoy,B.Marongiu,V.Castola,A.Piras,S.PorceddaandJ.Casanova,*Combinedanalysis byGC(RI),GC-MSand¹³C-NMRofthesupercriticalfluidextractofAbiesalbatwigs*.NaturalProduct Communications, 5(12), 1995-1998, 2010.
47. T. H. Thai, N. T. Hien, L. N. Diep, M. Paoli, J. Casanova and F. Tomi, *Chemical composition of needle, cone, and branch oilsfrom Vietnamese Pinus cernua*. Natural Product Communications. 14(5), 1-5, 2019.
48. A.M.Nam,A.Bighelli,M.Ghanmi,B.Satrani,J.CasanovaandF.Tomi,*Deodaroneisomersin Cedrus atlanticaessentialoils andtar oils*.NaturalProduct Communications. 10 (11),1905-1906,2015.
49. N.H.AndersenandM.S.Falcone,*Theidentificationofsescquiterpenehydrocarbonsfromgas-liquid chromatography retention data*. Journal of Chromatography A, 44, 52-59, 1969.
50. E., Bağci and M. T. Babaç, *A morphometric and chemosystematic study on the Abies Miller (Fir) species in Turkey*. Acta Botanica Gallica, 150(3), 355-367, 2003.
51. G.A.Burdock,*Fenaroli'shandbookofflavoringredients*,CRCPress.SydneyAustralia.2010.
52. Y.H.I.LaaksoandR.Hiltunen, *Theenantimericcompositionofmonoterpenehydrocarbonsasa chemotaxonomicmarkerinAbiessachalinensis(Fr.Schm.)Mast.andA.mayrianaMiy.etKudoneedle essential oils*. Flavour and Fragrance Journal, 9(5), 223-227, 1994.
53. N. V. Gerling, V. V. Punegov, I. V. Gruzdev and S. I. Tarasov, *Component composition of Abies sibirica (Pinaceae) needle essential oil from the Komi Republic*. Rastitel'nye Resursy, 54(1), 119-129, 2018.
54. A.Koedam,J.J.SchefferandA.BaerheimSvendsen,*MonoterpenesintheVolatileLeafOilof AbiesxarnoldianaNitz*.JournalofAgriculturalandFoodChemistry,28(4),862-866,1980.
55. S.Baran,S.H.vonReuss,W.A. KönigandD.Kalemba, *Compositionoftheessentialoilof Abies koreana Wils*. Flavour and Fragrance Journal, 22(1), 78-83, 2007.
56. H. J. Oh, H. M. Ahn, K. H. So, S. S. Kim, P. Y. Yun, G. L. Jeon and K. Z. Riu, *Chemical and antimicrobial properties of essential oils from three coniferous trees Abies koreana, Cryptomeria japonica, and Torreya nucifera*. Journal of Applied Biological Chemistry, 50(3), 164-169, 2007.
57. R. Schicchi, A. Geraci, S. Rosselli, A. Maggio and M. Bruno, *Chemodiversity of the essential oil from leaves of Abies nebrodensis (Lojac.) Mattei*. Chemistry & Biodiversity, 14(2), e1600254, 2017.
58. J. Neubeller, *Waxes and essential oils in needles of Abies species*. Gartenbauwissenschaft, 55(2), 55-59, 1990.

59. J. M. Sánchez-Robles, F. Balao, A. Terrab, J. L. García-Castaño, M. A. Ortiz, E. Vela and S. Talavera, *Phylogeography of SW Mediterranean firs: different European origins for the North African Abies species*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 79, 42-53, 2014.
60. G. Zeneli, C. Tsitsimpikou, P. V. Petrakis, G. Naxakis, D. Habili and V. Roussis, *Foliar and cortex oleoresin variability of silver fir (Abies alba Mill.) in Albania*. Zeitschrift für Naturforschung C, 56(7-8), 531-539, 2001.
61. Z. Wu, B. Tan, Y. Liu, J. L. Dunn, P. Martorell Guerola, M. Tortajada, Z. Cao and P. Ji, *Chemical composition and antioxidant properties of essential oils from peppermint, native spearmint and scotch spearmint*. Molecules, 24 (15), 2825. 2019.
62. X. Lin, S. Cao, J. Sun, D. Lu, B. Zhong and J. Chun, *The chemical compositions, and antibacterial and antioxidant activities of four types of Citrus essential oils*. Molecules, 26 (11), 3412. 2021.
63. C. L. Popa, A. Lupitu, M. D. Mot, L. Copolovici, C. Moisa and D. M. Copolovici, *Chemical and biochemical characterization of essential oils and their corresponding hydrolats from six species of the Lamiaceae family*. Plants, 10 (11), 2489. 2021.
64. N. Bibi Sadeer, D. Montesano, S. Albrizio, G. Zengin and M. F. Mahomoodally, *The versatility of antioxidant assays in food science and safety-Chemistry, applications, strengths, and limitations*. Antioxidants, 9 (8), 709. (2020).
65. A. Ivanova, E. Gerasimova and E. Gazizullina, *Study of antioxidant properties of agents from the perspective of their action mechanisms*. Molecules, 25(18), 4251. 2020.
66. M. Platzer, S. Kiese, T. Herfellner, U. Schweiggert-Weisz, O. Miesbauer, and P. Eisner, *Common trends and differences in antioxidant activity analysis of phenolic substances using single electron transfer based assays*. Molecules, 26 (5), 1244. 2021.
67. I. G. Munteanu and C. Apetrei, *Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review*. International Journal of Molecular Sciences, 22 (7), 3380. 2021.
68. K. G. Lee and T. Shibamoto, *Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(17), 4947-4952. 2002.
69. K. I. Berker, B. Demirata and R. Apak, *Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants in the same solution by using Ferric–Ferricyanide Assay*. Food Analytical Methods, 5, 1150-1158, 2012.
70. Ch V. Sivakumar, I. Meera, *Antioxidant and Biological Activities of Three Morphotypes of Murraya koenigii L. from Uttarakhand*. Journal of Food Processing & Technology, 4, 246, 2013.
71. S. B. Kedare, R. P. Singh, *Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay*. Journal of Food Science and Technology, 48, 412-422, 2011.
72. M. Andrade, M. das Graças Cardoso, J. de Andrade, L. Silva, M. Teixeira, J. Valério Resende, A. da Silva Figueiredo and Barroso, J., *Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Cinnamodendron dinisii Schwacke and Siparuna guianensis Aublet*. Antioxidants, 2(4), 384-397, 2013.
73. A. Adjaoud, H. Laouer, A. Braca, P. Cioni, K. Moussi, M. Berboucha-Rahmani, H. Abbaci and D. Falconieri, *Chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of a new essential oil*

chemotype of Pinus nigra ssp. *mauretanica* (Pinaceae), Northern Algeria. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(2), 358-369, 2022.

74. P.A. Postu, F.Z. Sadiki, M. El Idrissi, O. Cioanca, A. Trifan, M. Hancianu and L. Hritcu, *Pinus halepensis* essential oil attenuates the toxic Alzheimer's amyloid beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 112, 108673, 2019.

75. S. Bhavaniramy, S. Vishnupriya, M. S. Al-Aboody, R. Vijayakumar and D. Baskaran, *Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications*. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49-55, 2019.

76. D.d.F. Ferreira, F.M.D. Nora, B.N. Lucas, C.R.d. Menezes, A.J. Cichoski, S.R. Giacomelli, R. Wagner and J.S. Barin, *Oxygen introduction during extraction and the improvement of antioxidant activity of essential oils of basil, lemon and lemongrass*. *Ciência Rural*, 47(8), 1-6, 2017.

77. R. Nehme, S. Andrés, R.B. Pereira, M. Ben Jemaa, S. Bouhallab, F. Ceciliani, S. López, F.Z. Rahali, R. Ksouri, D.M. Pereira and L. Abdennebi-Najar, *Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality*. *Antioxidants*, 10, 330, 2021.

78. H. Zengin and A. Baysal, *Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy*. *Molecules*, 19, 17773-17798, 2014.

79. R. Amorati, M. C. Foti and L. Valgimigli, *Antioxidant activity of essential oils*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10835-10847, 2013.

80. T.C. Dos Santos, T.M. Gomes, B.A.S. Pinto, A.L. Camara and A.M.A. Paes, *Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy*. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1192, 2018.

81. M.R. Loizzo, R. Tundis, F. Conforti, F. Menichini, M. Bonesi, F. Nadjafi, N.G. Frega and F. Menichini, *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) extract demonstrates in vitro antioxidant properties and cholinesterase inhibitory activity, *Nutrition Research*, 30(12), 823-830, 2010.

82. SK. Bardaweel, MM. Hudaib, KA. Tawaha and RM. Bashatwah, *Studies on the in vitro antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with Chrysanthemum coronarium essential oil*. *Evid-Based Complementary Alternat Med: eCAM*. 2015; 790838. 2015.

83. S. Karakaya, G. Eksi, M. Koca, B. Demirci, H.C. Kaymak, M.E. Kaplan and O. Aksakal, *Chemical and morphological characterization of Allium tuncelianum (Amaryllidaceae) and its antioxidant and anticholinesterase potentials*. In *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 76, 2, p. e085. 2019.

84. F. Burčul, I. Blažević, M. Radan and O. Politeo, *Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oil constituents as inhibitors of cholinesterases*. *Current Medicinal Chemistry*, 27(26), 4297-4343. 2020.

85. N. S. Perry, P. J. Houghton, A. Theobald, P. Jenner and E. K. Perry, *In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(7), 895-902, 2000.

86. F. Burčul, M. Radan, O. Politeo and I. Blažević, (2017). *Cholinesterase-inhibitory activity of essential oils*. Advances in Chemistry Reserch, 37, 15-86.
87. R.Ceylan,G.Zengin,S.Uysal,V.Ilhan,A.Aktumsek,A.KandemirandF.Anwar,*GC-MSanalysis and in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of endemic Thymus spathulifolius Hausskn. et Velen*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31(6), 983-990. 2016.
88. S.Ahmad,F.Ullah,A.Sadiq,M.Ayaz,M.Imran,I.Ali,A.Zeb,F.UllahandM.R.Shah,*Chemical composition, antioxidant and anticholinesterase potentials of essential oil of Rumex hastatus D. Don collected from the North West of Pakistan*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16, 29. 2016.
89. L.Caputo,F.Capozzolo,G.Amato,V.DeFeo,F.Fratianni,G.VivenzioandF.Nazzaro,*Chemical Composition,Antibiofilm,Cytotoxic, and Anti-AcetylcholinesteraseActivitiesof MyrtusCommunis,L. Leaves Essential Oil*. BMC Complementary Medicine and Therapies. 2022, 22, 142.

InhonourofProfessorRobertAdams

RobertAdamswasawellaccomplishedscientist.He maybegonebuthewillnotbeforgottenbyany ofusthathetouchedinsomewayoranother.Ihavebenefitedfromhisguidanceformyresearch.As recognition, this work will be dedicated to his memory. Rest in peace Robert.

Iswinunadi-yada¹eyernlliqanisekla(phytochimie)sinniseklamuc²enyernaqlilitdeg degiseklantmurtnezzayer:taydiwindtumert.A³eyyernliqqadjllaj-nsendnnfe⁴,izmerad iqqel deg umkan n zzit luzin. Iwakken a d-yettwakkes zzit yellan deg-sen ad ifur s wamek ara d-iqu⁵er. Sfurayen ama d afriwen, ama d isagharen ama d izumbayen. S yinna ayen akken i-d- iqa⁶ren, ad itt⁷r; amek iga (ama deg tuzert, deg ucercer d jllaj) seg tama, seg tama nni⁸en a d- ibindegteqse⁹ maqessi¹⁰ na¹¹ aladter¹² imayreqqne¹³ ala.A¹⁴eyyer-isyettil-dsttamilGC,GC- MS,HS-SPME,GC-FIDet¹⁵13C-RMN,dInvitroviad(DPPH,ABTS,Mo,FRAP, β -carotène).

MadttawilnAChEdBChEyenna-dilhauris¹⁶alma¹⁷erra¹⁸eftezmert.Dddwanttjurdayen I -d-yettem¹⁹ayen, ineqq akuz n *Callosobruchus maculatus*. Zzit-a, ur ireqq ara, ilha deg ddwa i ttjur d tfellaht. Ineqq tawekka *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya dadantii* d *Dickeya solani* yekkatén lbatata, ineqq abe²⁰uc *Botrytis cinerea*, *Muccor* sp. et *Alternaria* sp. Yettak-d rriha tesganay (proline,H₂O₂, pigments chlorophylliens, peroxydation lipidique, perte d'H₂O, fuite d'électrons) kra n te²¹cicin d imer²²an s ttawil ur gemmunt ara am tid ur ttneqqil ara (*Phalaris canariensis*, *Sinapis arvensis*) d tid n wučči (*Triticum durum*, *Raphanussativus*).Ayenid-yeffghensegunadi-ya;isekla-ya²³le²⁴menmli²⁵.Dacukana²⁶am-aimxalafsegyiferdu²⁷ardwandanni²⁸en.Imxalafda²⁹entemxalafala³⁰la³¹sabnttawildssenf n u³²eyyer. Aya yesseken-d d akken, zzit-a, ur ireqq ara, ittdawi terna ineqq ibe³³ac d tweeka. Ilha d ddwa i ttjur d wakal issengar yir rrbil³⁴.

Tigejda n wawalen: Taydiwin, tumert, zzit n tayda, asqqiter d ufewwer, GC, GC-MS, HS-SPME, GC-FID,¹³C-RMN, i³⁵qqaren, tte³⁶ma, a³⁷eyyer.

كان الهدف من هذا البحث توصيف جيو كيمياء *Pinus numidica* (d'Abies et nigra)

تحليل تركيز يوتهم العطرية وتقييم مكانيتهم البيولوجية كبديل للمنتجات الكيميائية الصناعية باستخلاص الزيوت

العطرية من أوراقيهم، وفروهم ومخاريهم بواسطة التقطير المائي وتحليلها فيما يتعلق بالخصائص الفيزيائية (والكيمائية

(مؤشر الحموضة، مؤشر أوكسدة البروكسيدات). تم تحديد التركيب الكيميائي باستخدام ^{13}C -RMN (et GC-FIDHS-SPME, GC,

MS,) GC,

MS,) GC, DPPH, ABTS, Mo, FRAP, β -carotène (الكسدة في المختبر

ختبار النشاط المثبط للإنزيمات AChE (et.) BChE كما تم إجراء اختبار التحكم الحيوي في المختبر

فعالية الزيوت في الحياة الواقعية (*Callosobruchus maculatus*) وقد أكدت تقييمات السمية على

سالمة الزيوت، مما يدعم إمكانية دمجها في برامج الصحة الوقاية النباتية وكذا في صناعات منتجات الحماية المحاصيل. تدراسة التأثير المضاد للجراثيم

بكتيريا (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya dadantii*)

Botrytis cinerea, (*Dickeya solani*) ضد الفطريات النباتية

Mucor (*Alternaria* sp.) في مكافحة العشب الضار للمحاصيل الزراعية، تمت في الظروف

المختبرية دراسة الأثر المثبط للنباتات آلية العمل من خلال العالمات الجهاد الفسيولوجي (H_2O_2 , proline,

pigments chlorophylliens, peroxydation lipidique, perted' H_2O , fuité d'électrons)

Phalaris arvensis (Sinapiscanariensis), *Triticum sativus* أظهرت النتائج وجود تركيز عال للمركبات الفعالة في

الغذائية (*Triticum sativus* (Raphanus durum, sativus) أظهرت النتائج وجود تركيز عال للمركبات الفعالة في

أجزاء النباتات المختلفة التي تمدرستها، مع تباين في الفاعلية على الأعضاء والاختبار المستخدم والكائنات المستهدفة والمعايير التجريبية (التركيز، المدة). هذه المركبات أظهرت

خصائص مضادة لأوكسدة والأنزيمات والحشود للميكروبات، الطفيليات والعشب الضار للمحاصيل الزراعية، مما يستوجب تسليط الضوء على

إمكاناتها كمواد ملزمة بيولوجية متعددة الاستخدامات متوافقة مع البيئة.

المفتاحية *Pinus numidica*: *mauretanica* sp. *nigra*، الزيوت العطرية، التقطير المائي،

GC, MS,) GC, ^{13}C -RMN (et GC-FIDHS-SPME, GC-MS,) GC, التركيب الكيميائي، الفعالية البيولوجية

L'objectif de cette recherche était de caractériser la phytochimie de *Pinus nigra* et d'*Abies numidica*, deux espèces emblématiques et rares de la flore algérienne, en analysant la composition de leurs huiles essentielles et en évaluant leur potentiel biologique en tant qu'alternatives aux produits de synthèse chimique. Les huiles essentielles, extraites par hydrodistillation des feuilles, branches et cônes, ont été soumises à des analyses physiques (densité, pouvoir rotatoire, indice de réfraction) et chimiques (indice d'acide, indice de peroxyde). La composition chimique a été déterminée par GC, GC-MS, HS-SPME, GC-FID et ^{13}C -RMN. Les propriétés antioxydantes ont été évaluées *in vitro* via des tests de (DPPH, ABTS, Mo, FRAP, β -carotène), et l'activité anti-enzymatique a été testée sur l'AChE et BChE. Des essais de biocontrol ont été réalisés en laboratoire sur des organismes nuisibles en agriculture. L'efficacité *in vivo* des huiles a été testée contre *Callosobruchus maculatus*, un insecte ravageur des denrées stockées. Les évaluations de toxicité ont confirmé l'innocuité des huiles, soutenant leur potentiel d'intégration dans l'industrie phytosanitaire. L'effet antimicrobien a été examiné contre les bactéries *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya dadantii* et *Dickeya solani*, responsables de la pourriture de la pomme de terre, ainsi que contre les champignons phytopathogènes *Botrytis cinerea*, *Mucor* sp. et *Alternaria* sp. En allélopathie, l'impact antigerminatif et le mécanisme d'action ont été étudiés à travers des marqueurs de stress physiologique (proline, H_2O_2 , pigments chlorophylliens, peroxydation lipidique, perte d' H_2O , fuite d'électrons) sur les stades de graines et plantules de certaines adventices (*Phalaris canariensis*, *Sinapis arvensis*) et de cultures vivrières (*Triticum durum*, *Raphanus sativus*). Les résultats indiquent une concentration élevée de composés bioactifs dans les différents organes des plantes étudiées, avec une variabilité de l'efficacité en fonction de l'organe, du test utilisé, de l'organisme cible et des paramètres expérimentaux (concentration, durée). Ces composés ont démontré des propriétés antioxydantes, anti-enzymatiques, insecticides, antimicrobiennes et herbicides, soulignant leur potentiel en tant qu'agents de biocontrôle polyvalents et écoresponsables.

Mots-clés: *Pinus nigra* sp. *mauretanica*, *Abies numidica*, Huiles essentielles, Hydrodistillation, GC, GC-MS, HS-SPME, GC-FID, ^{13}C -RMN, Composition chimique, Activités biologiques.

Abstract

The aim of this research was to characterize the phytochemistry of *Pinus nigra* and *Abies numidica*, two emblematic and rare species of the Algerian flora, by analyzing the composition of their essential oils and assessing their biological potential as alternatives to harmful synthetic products. Essential oils, extracted by hydrodistillation from the needles, branches, and cones, underwent physical (density, optical rotation, refractive index) and chemical (acid value, peroxide value) analyses. The chemical composition was determined using GC, GC-MS, HS-SPME-GC-MS, GC-FID, and ^{13}C -NMR. Antioxidant properties were evaluated *in vitro* using assays such as DPPH, ABTS, Mo, FRAP, and β -carotene, while anti-enzymatic activity was tested against AChE and BChE. Biocontrol assays were conducted in the laboratory on agricultural pests. The *in vivo* efficacy of the oils was tested against *Callosobruchus maculatus*, an insect pest of stored food products. Toxicity assessments confirmed the safety of the oils, supporting their potential integration into the phytosanitary industry. The antimicrobial effect was examined against bacteria such as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya dadantii*, and *Dickeya solani*, which are responsible for potato rot, as well as against phytopathogenic fungi such as *Botrytis cinerea*, *Mucor* sp., and *Alternaria* sp. In allelopathy, the antigerminative impact and the mechanism of action were investigated through physiological stress markers (proline, H_2O_2 , chlorophyll pigments, lipid peroxidation, water loss, electron leakage) on the seed and seedling stages of certain weeds (*Phalaris canariensis*, *Sinapis arvensis*) and food crops (*Triticum durum*, *Raphanus sativus*). The findings indicate a high concentration of bioactive compounds in the various plant organs studied, with efficacy varying according to the organ, test employed, target organism, and experimental parameters (concentration, duration). These compounds exhibited antioxidant, anti-enzymatic, insecticidal, antimicrobial, and herbicidal properties, highlighting their potential as multifaceted and eco-compatible biocontrol agents.

Keywords: *Pinus nigra* sp. *mauretanica*, *Abies numidica*, Essential oils, Hydrodistillation, GC, GC-MS, HS-SPME, GC-FID, ^{13}C -NMR, Chemical composition, Biological activities.