



République algérienne démocratique et populaire
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques



Département de biologie

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention de diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biodiversité et physiologie végétale

Thème

Extraction des huiles essentielles de pin d'Alep (*Pinus halepensis*) et géranium rosat (*Pelargonium roseum*) et estimation de leurs effets sur la croissance de deux pathogènes de l'homme.

Présenté par :

M^r Cherik Mhenna

M^r Hamdad Sofiane

Devant les jurys :

Président : M^r Nait Mouloud Mohamed MCB (UMMTO)

Promotrice : Mme Taleb- Tudert Karima MCA (UMMTO)

Examineur : M^r Medjbeur Djamel MCB (UMMTO)

2022/2023

Remerciements

Avant d'entamer la présentation de notre travail, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la persévérance pour affronter toutes les difficultés durant ce parcours universitaire et aboutir à ce modeste travail.

Nous remercions également Mme Taleb Tudert Karima pour son aide, son encadrement, sa disponibilité, son dévouement et ses orientations, avec qui on a passé une année dans une agréable ambiance.

Nul mot ne peut exprimer notre reconnaissance et nos remerciements les plus distingués à nos très chers parents pour leur soutien incontestable ainsi que leurs encouragements.

Nous remercions les membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer et consacrer le temps d'examiner notre travail.

A monsieur Nait Mouloud d'avoir accepté de présider le jury d'examination et Monsieur Medjbeur Djamel d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos remerciements à tous nos amis et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Merci à tous.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui et qui m'ont soutenu depuis mon premier jour à l'école, aucun remerciement n'est à la hauteur d'exprimer votre dévouement et vos sacrifices

A mon binôme M'henna pour les moments vécus ensemble, A nos futurs projets.

A mes enseignants qui m'ont accompagné et orientés durant mes études depuis le cycle primaire.

A mes nombreux amis qui m'ont aidé pour l'élaboration de ce projet et pour la totalité des réussites atteintes dans ma vie.

Sofiane

Dédicaces

Ce mémoire est dédié

A ma famille, source inépuisable de soutien et d'amour, sans laquelle cette réalisation n'aurait pas été possible.

A mon binôme Sofiane qui a été comme un frère

A mes amis, pour leur encouragement constant et leur précieuse amitié

A mes enseignants, pour leur savoir et leur guidance qui m'ont guidé tout au long de ce voyage académique.

Enfin, à toutes les personnes qui croient en moi.

M'henna

Table des matières

1.1 Définition Des Huiles Essentielles	2
1.2 Localisation	2
1.3 Composition chimique	3
1.3.1 Groupe des terpénoïdes	3
1.3.2 Les Monoterpènes	3
2. Facteurs de variabilité des huiles essentielles	5
2.1 Facteurs Internes influençant la variabilité des huiles essentielles.....	5
2.2 Facteurs externes influençant la variabilité des huiles essentielles	5
2.2.1 Les facteurs climatiques	6
2.2.2 Facteurs édaphiques	6
2.2.3 Les pratiques culturales	6
3. Les Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	6
3.1 Les Méthodes classiques d'extraction des huiles essentielles	7
3.1.1 L'hydro distillation.....	7
3.1.2 Entraînement à la vapeur d'eau.....	7
3.1.3 Distillation sèche	8
3.1.4 Expression à froid.....	9
3.2 Les méthodes non conventionnelles d'extraction des huiles essentielles.....	9
3.2.1 Extraction par les gaz supercritiques.....	9
3.2.2 Extraction par micro-ondes	10
4. Importance des huiles essentielles en phytothérapie	10
4.1. Pouvoir Antibactériens	11
4.2. Pouvoir Antivirales.....	11
4.3. Pouvoir anti oxydant	11
4.4. Pouvoir antiseptique.....	11
4.5. Pouvoir Anti-inflammatoire	11
5. Rôles Physiologiques des huiles essentielles	12
Chapitre II	13
Monographies des plantes étudiées.....	13
1. Le Pin d'Alep.....	14
1.1. Généralités.....	14
1.2. La classification de Pin d'Alep.....	14

Table des matières

1.3. Caractéristiques botaniques	15
1.4. Répartition du pin d'Alep en Algérie	16
2. Le Géranium (<i>Pélargonium roseum</i>)	16
2.1. Présentation de la famille des Géraniacées (<i>Geraniaceae</i>)	16
2.2. Caractéristiques botaniques	16
2.3. Répartition en Algérie	17
2.4. Classification phylogénétique	18
Chapitre III.....	19
Matériel et méthodes.....	19
1. Localisation de la zone d'étude	20
2. Réalisation de coupes anatomiques pour l'étude des structures sécrétrices d'huiles essentielles à la microscopie optique	20
2.1. Réalisation des coupes anatomiques	21
2.2. La double coloration.....	21
3. Extraction des huiles essentielles à partir des fleurs de <i>Pelargonium roseum</i> et des pseudophylles de <i>Pinus halepensis</i>	21
3.1. Détermination du taux d'humidité du matériel végétal	23
3.2. Calcul du rendement en huile essentielle	24
4. Evaluation de l'effet des huiles essentielles sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i>	24
4.1. Souches bactériennes.....	24
4.2. Revivification microbiologique des souches microbiennes	24
4.3. Repiquage sur les milieux sélectifs	24
4.4. Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum)	25
4.5. Méthode de diffusion.....	25
4.6. Détermination de la CMI par la méthode de microplaque à 96 puits	26
Chapitre VI.....	27
Résultats et discussion	27
1. Rendement en huiles essentielle.....	28
2. Étude histoanatomique	28
2.1. La feuille de géranium roseum	28
2.2. La tige de <i>Geranium roseum</i>	29
2.3. Structures sécrétrices.....	30
2.4. La tige de pin d'Alep.....	31

Table des matières

3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	32
3.1. Technique de l'antibioaromatogramme.....	32
3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles (CMI)	34

Liste des Figures

Figure 1 : Structure de base des terpènes (Guignard,2000)	3
Figure 2 : Structures chimiques des principaux composants des HEs (Bakkaliet al,2008).	4
Figure 3 : Dispositif d'extraction par hydro distillation(Originale 2023)	7
Figure 4 : Principe schématique de l'extraction par entrainement à la vapeur d'eau (Ferhat,2010). Erreur ! Signet non défini.	
Figure 5 : Schéma d'une installation de distillation sèche d'après Duval (2012) Erreur ! Signet non défini.	
Figure 6 : Expression à froid de l'essence de Citrus Bousbia (2011) Erreur ! Signet non défini.	
Figure 7 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (Lucchesi et al., 2007) Erreur ! Signet non défini.	
Figure 8 : individu adulte de pin d'Alep (<i>Pinushalepensis</i>) (Original 2023). Erreur ! Signet non défini.	
Figure 9 : Caractéristiques botanique de <i>Pinush alpenesis</i> (original 2023). Erreur ! Signet non défini.	
Figure 10 : Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (seigue,1985) Erreur ! Signet non défini.	
Figure 11 : Géranium rosat (originelle 2023).	17
Figure 12 : Localisation du site de prélèvement des plantes étudiées (Google map).	20
Figure 13 : Extracteur pilote (Taleb, 2015).	22
Figure 15 : Huile essentielle de géranium rosat (originale 2023	23
Figure 14 : Huile essentielle de pin d'Alep .	23
Figure 16 : Méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri (Ouaar, 2018).	26
Figure 17 : Coupe transversale de la feuille de <i>Pelargoniumroseum</i> (G 10X10).	29
Figure 18 : Coupe anatomique de la tige de <i>Pelargoniumroseum</i> (MO : Gx40).	29
Figure 19 : Observation microscopique d'un poil sécréteur (M.O: Gx40).	30
Figure 20 : Coupe transversale de la feuille de pin d'Alep (MO : G10).	31
Figure 21 : Effet des huiles essentielles sur la croissance bactérienne.	32

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Taux d'humidité et des rendements en huiles essentielles.

Tableau 2 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de géranium et pin d'Alep exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en Cm.

Tableau 3 : Détermination des CMI des huiles essentielles de géranium et pin d'Alep.

Introduction

L'extraction des huiles essentielles est une pratique ancienne qui revêt aujourd'hui un intérêt croissant en tant qu'alternative aux antibiotiques, dans le domaine de la médecine (OMS, 2021). Ces substances naturelles, riches en composés actifs, possèdent de nombreuses propriétés thérapeutiques (Ouissam, 2014), dont certaines ont montré leur efficacité dans le traitement des infections bactériennes. Leur utilisation en remplacement des antibiotiques suscite un intérêt particulier dans un contexte où la résistance à ces derniers devient un problème de santé publique majeur.

En effet, de nombreuses études scientifiques ont démontré l'efficacité des huiles essentielles contre diverses souches bactériennes, tout en limitant les risques de résistance. Une étude menée par Bakkali et al. (2008) a notamment mis en évidence l'activité antibactérienne de plusieurs huiles essentielles, telles que celles d'origan, de thym et de cannelle, contre des bactéries pathogènes couramment rencontrées dans les infections humaines. Cette approche prometteuse offre une alternative intéressante aux antibiotiques classiques, et ouvre la voie à de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections bactériennes. Ainsi, les huiles essentielles de géranium rosat et pin d'Alep sont particulièrement intéressantes en raison de leur large spectre d'activité contre les bactéries (Zouari-ben Bechir et al., 2017). *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont deux espèces bactériennes couramment rencontrées dans l'environnement. *Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif, souvent présente sur la peau et les muqueuses, tandis que *Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif qui se trouve principalement dans le tube digestif des êtres humains et des animaux. Ces deux bactéries peuvent parfois causer des infections chez l'homme, provoquant des symptômes divers, allant des infections cutanées bénignes aux infections urinaires ou gastro-intestinales plus graves. Le traitement classique de ces infections implique souvent l'utilisation d'antibiotiques. Cependant, il y a un intérêt croissant pour les huiles essentielles en tant qu'approche alternative ou complémentaire pour le traitement des infections bactériennes (Ventola, 2015). Dans ce contexte, à quel point ces huiles essentielles vont-elles démontrer leur efficacité ?

Dans ce travail, nous explorerons en premier lieu les différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles, ainsi que leur potentiel en tant qu'alternatives aux antibiotiques. Et la présentation des espèces étudiées, le géranium rosat et le pin d'Alep. Dans la seconde partie sera présentée l'étude expérimentale dans laquelle, une partie matériel et méthodes fait le bilan précis des outils, concepts et équipement utilisés au cours de ce travail. La troisième partie comportera les résultats et discussion. En fin nous clôturerons par une conclusion ainsi que les perspectives d'étude.

Chapitre 01

Généralités sur les huiles essentielles

1.1 Définition Des Huiles Essentielles

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) , Définis les HE comme des produits obtenus à partir de matières premières végétales par pression ou distillation (Stevanovic 2020).

Les huiles essentielles sont des liquides concentrés de mélanges complexes de composés volatils, huileux ,hydrophobes ,aromatiques, pouvant être extraites de différentes parties de plantes telles que l'écorce, les bourgeons, les fleurs, les fruits, les feuilles, les pelures, les racines, les graines, les brindilles ou la plante entière d'une source botanique unique (Falleh *et al.*, 2020, Stephane et Jules, 2020).

Selon AFNOR (Association Française de Normalisation) : c'est un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche.

1.2 Localisation

Les plantes capables de synthétiser les HE ne sont quasiment que des végétaux supérieurs (Bruneton,1999), formant un nombre restreint de familles, ex : Lauracées, Myrtacées, Rutacées, Apiacées, Lamiacées, Astéracées, Poacées...Etc. (Dorosso,2002). Tous les organes végétaux contiennent des huiles essentielles, en particulier les sommités fleuries (lavande, menthe). Elles se trouvent également dans l'écorce (cannelle), les feuilles (citronnelle, eucalyptus), la racine (vétiver), le rhizome (gingembre), les fruits (fenouil, anis),les boutons floraux (Clou de girofle), les graines (muscade) et les lebois(camphre), (Belaiche, 1979 ; Bruneton, 1999 ; Ghestem et al., 2001).

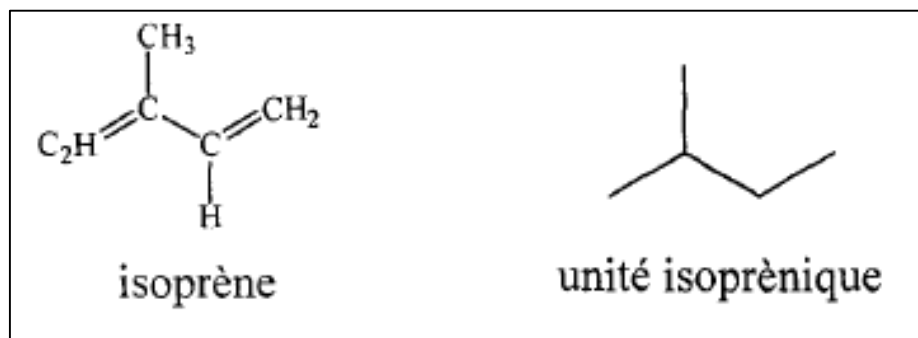
Selon Deysson (1979) les huiles essentielles représentent les produits du métabolisme cellulaire secondaire . Elles sont produites dans le protoplasme cellulaire des plantes aromatiques. L'accumulation de ces dernières est associées à la présence de structures histologiques spécialisées qui diffèrent selon l'espèce botanique . Elles peuvent être des canaux sécréteurs ou des poils sécréteurs, des cellules sécrétrices, des poches sécrétrices. D'après Guignard et al. (1985), Il n'y a pas de règles générales concernant le site d'accumulation des métabolites secondaires tels que les huiles essentielles dans les organismes végétaux. Par contre pour Garneau (2004), affirme que la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes. Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs. Souvent la teneur en HE est inférieure à 1%. Il existe, cependant, des exceptions telles que le clou de girofle qui renferme plus de 15%, (Ghestem *et al.* ,2001).

1.3 Composition chimique

Les huiles essentielles sont très variables et complexe cela est due à la différence de leurs composition chimique (Bakkali *et al* 2008, Couic-Marinier et Lobsteine, 2013.). Cette complexité des HE est liée à des mélanges de nombreux constituants au proportions très différentes (Cabral *et al.*, 2013). Les monoterpènes sont les composants prédominants des HE (90 %), suivis par les sesquiterpènes (Falleh *et al.*, 2020). Selon Dorosso (2002), les HE sont composées par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

1.3.1 Groupe des terpénoïdes

Ce sont les molécules les plus répandues dans les HEs (Masyita *et al.*, 2022) Ils ont généralement des effets thérapeutiques assez faibles, mais ils viennent nuancer ou compléter les actions des autres composants plus actifs (Laguerre, 2015). Ce groupe se divise selon le nombre d'unités isopréniques qui le constitue, On trouve : Les hémiterpènes qui sont formés d'une unité d'isoprène (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpène (C15), diterpènes (C20), triterpènes (C30) et tétraterpènes (C40) (Bhavaniramya *et al.*, 2019).



1.3.2 Les Monoterpènes

Ils sont formés à partir du couplage de deux motifs isoprène (C10). Ce sont les molécules les plus représentatives chez les HEs, Ils sont constitués de plusieurs fonctions : Carbures, Alcools, Aldéhydes, Esters, Éthers et Phénols.

1.3.3 Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes : sont composés de trois unités d'isoprènes (C15). La structure et la fonction des sesquiterpènes sont semblables à ceux des monoterpènes : Carbures, Alcools, Cétones et Époxydes.

1.3.4 Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont moins fréquents que les terpènes. Ils comprennent des aldéhydes, des alcools, des phénols et des méthyls, (Bakkali *et al.*2008).

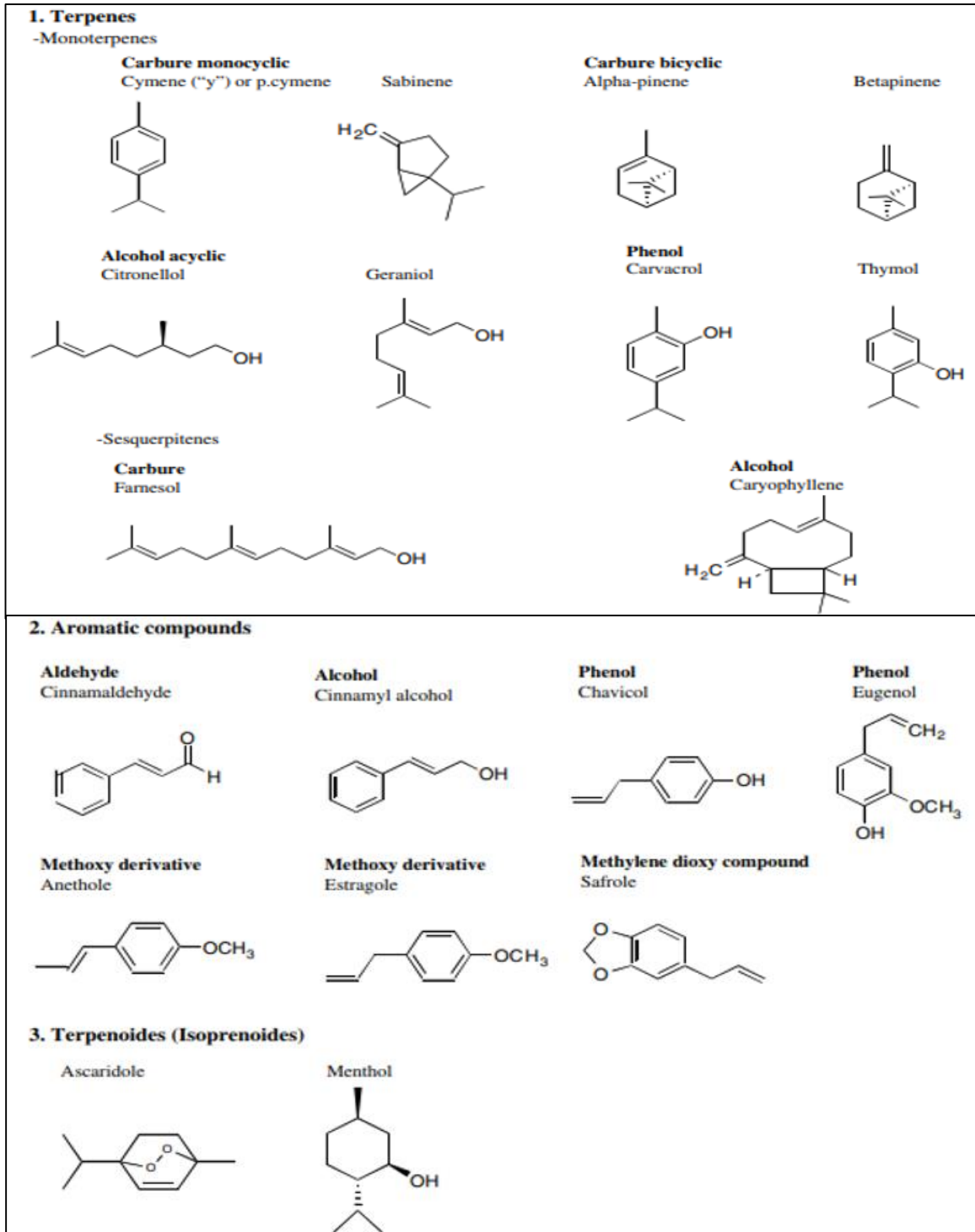


Figure 2 : Structures chimiques des principaux composants des HEs (Bakkali *et al.*,2008).

1.3.3. Composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruit compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en retenir (Brunetton, 1999).

2. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

La composition des HE dépend de plusieurs facteurs. Selon Senator (1996) in (Djibo *et al.*, 2004) la variation de la composition et l'absence de certains constituants dépendent de trois facteurs, le patrimoine génétique, l'âge et l'environnement de la plante. La méthode d'extraction affecte aussi le rendement et la composition chimique des huiles essentielles qui changent en fonction de cette dernière (Khajeh *et al.* 2005 ; Viljoen *et al.* 2006),

Les facteurs de variabilité des huiles essentielles peuvent être imputés à 2 types de facteurs : les facteurs internes qui sont liés à la plante en elle-même et les facteurs externes qui sont des facteurs environnementaux.

2.1 Facteurs Internes influençant la variabilité des huiles essentielles

Ce sont des facteurs qui sont liés à la plante en elle-même, comme l'espèce botanique et la variété du matériel botanique, le cycle végétatif mais aussi à l'organe végétal utilisé et sa fraîcheur. Tucarov (1964) note la disparition de 15% de produits volatils dans le végétal après 3 mois de stockage et de 80% après neuf années. La qualité des essences obtenues dépend en grande partie de l'état de fraîcheur du végétal et du temps écoulé entre la récolte et son utilisation.

2.2 Facteurs externes influençant la variabilité des huiles essentielles

Les plantes sont confrontées durant leur cycle de vie à de nombreux changements qui varient selon l'environnement où elles vivent. Il a été constaté que l'HE de menthe dont la concentration en menthol, composé actif de l'HE, peut augmenter pendant la journée et diminuer pendant la nuit.

D'autres composés tels que le menthone, le menthofurane, et les monoterpènes, peuvent également varier en fonction du cycle nyctéméral.

Il est important de noter que ces variations peuvent différer selon les espèces végétales, les conditions de culture, et d'autres facteurs environnementaux spécifiques.

2.2.1 Les facteurs climatiques

Les facteurs climatiques se résument en : température, l'humidité relative, le régime des vents, l'alternance de chaleur et de la lumière . C'est le cas chez la menthe poivrée (*Menthapiperita*), pour que la plante quitte la phase végétative, elle nécessite des longueurs d'ondes longues , c'est une plante du jour long . Ce changement implique le changement de la composition de l'huile essentielle. En générale, des jours longs et des nuits tempérées augmentent le rendement en huile essentielle (Guignard,1983).

2.2.2 Facteurs édaphiques

L'influence du sol ou facteur édaphique est aussi très grande. Les propriétés physiques du sol (porosité, rétention d'eau...), sa nature (argileuse, sablonneuse...), sa composition (teneur en azote, terrains calcaires, siliceux...) etc., sont des facteurs déterminants pour la végétation (Guignard ,1983).Selon des études faite par Andreani (2014) Les caractéristiques pédologiques des sols semblent être à l'origine de la diversité chimique des huiles essentielles.

2.2.3 Les pratiques culturales

Les pratiques culturales sont relatives à la densité de la population, l'intensité et les modalités de l'irrigation mais aussi à l'apport des engrais, ces derniers sont également déterminants sur le rendement et la qualité de l'huile essentielle.

3. Les Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les essences aromatiques des végétaux. Selon la sixième édition de la Pharmacopée européenne (2008), les huiles essentielles sont obtenues par : l'Hydro-distillation, entraînement à la vapeur d'eau, la distillation sèche et par procédé mécanique sans chauffage. Il existe néanmoins d'autres méthodes non conventionnelles comme L'extraction par les fluides (gaz) supercritiques ou par l'utilisation des micro-ondes. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction des caractéristiques physico-chimiques et la nature de la matière végétale à traiter.

3.1 Les Méthodes classiques d'extraction des huiles essentielles

Ce sont les méthodes les plus utilisées pour l'extraction des HEs (Stephane *et al* 2020) elles sont résumées pour l'essentiel ci-dessous.

3.1.1 L'hydro distillation

C'est la technique la plus simple et la plus utilisée à l'heure actuelle. Son principe consiste à immerger le matériel végétal dans un alambic rempli d'eau, puis porté sur une source de chaleur jusqu'à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées par la surface froide du réfrigérant, l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité.

Pour obtenir une huile essentielle de première qualité, certains critères doivent être respectés : le matériau de l'alambic, la pression, la durée de la distillation, et la nature de l'eau.

La distillation doit s'effectuer à basse pression, entre 0,05 et 0,10 bars pour éviter la suroxydation sous haute pression. L'alambic doit être de préférence en acier inoxydable La durée de la distillation doit être prolongée pour recueillir la totalité de l'huile essentielle et éviter de recourir aux solvants chimiques (Socasau,2017). (Figure 3)



Figure 3 : Dispositif d'extraction par hydro distillation(Originale 2023)

3.1.2 Entraînement à la vapeur d'eau

C'est une variante de la distillation où il n'y a pas de contact direct entre la matière végétale et l'eau ce qui limite les phénomènes d'altérations hydrolytiques (Rojas et Buitrago, 2015) et de solubilisation de certains composés hydrosolubles (comme les phénols).(Figure 4)

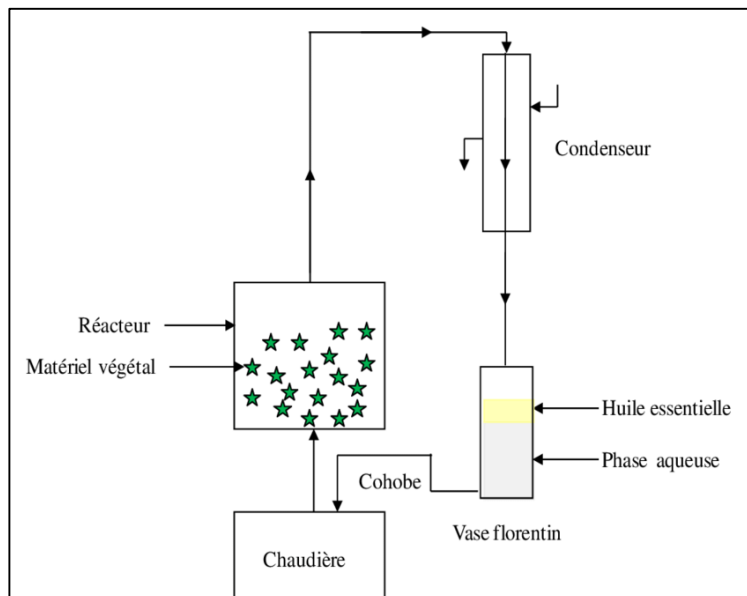


Figure 4 : Principe schématique de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Ferhat,2010).

3.1.3 Distillation sèche

La distillation sèche est une méthode d'extraction reconnue par la pharmacopée européenne, très peu utilisée car son rendement est très faible. Cette technique consiste à mettre la matière première sous un chauffage doux inférieur à 100°C sans ajouter de l'eau ou solvant organique. Les substances volatiles sont condensées par le contact avec une surface froide puis récupérées. Cette méthode permet de préserver les substances volatiles de l'hydrolyse et au phénomène de dénaturation lié au chauffage (Duval,2012) (Figure 5).

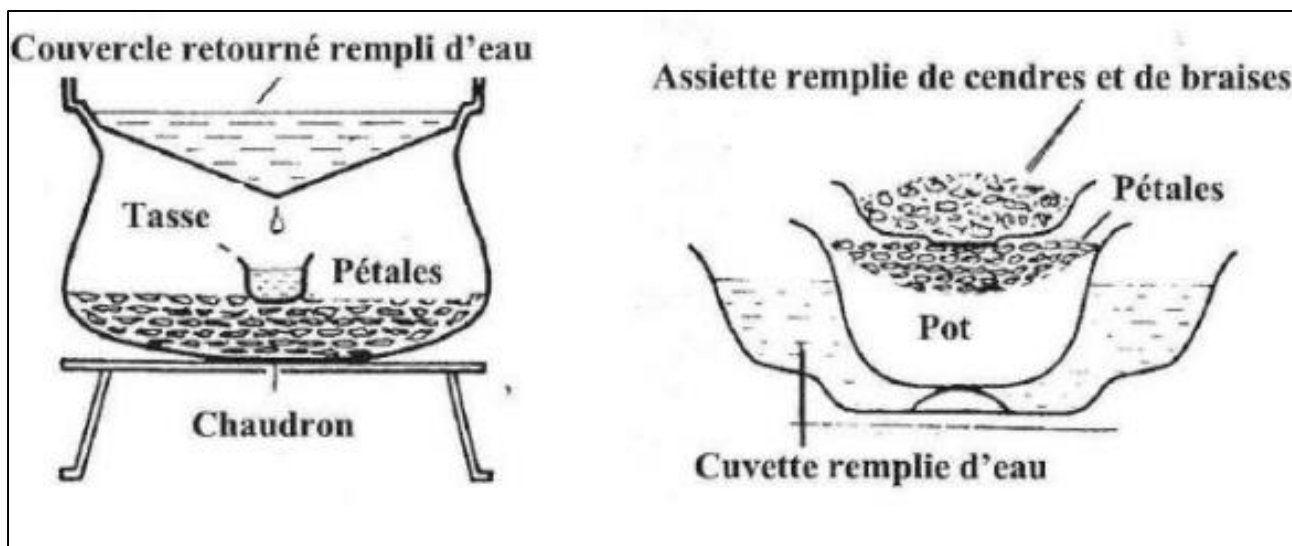


Figure 5 : Schéma d'une installation de distillation sèche d'après Duval (2012)

3.1.4 Expression à froid

L'expression à froid est un procédé mécanique sans chauffage selon la pharmacopée européenne. Cette méthode n'est valable que pour la production des huiles essentielles des fruits des agrumes (Citrus). Cette technique va de la simple abrasion du zeste du fruit au broyage de la peau dans son intégralité. Le produit obtenu est nommé essence. (Figure6)

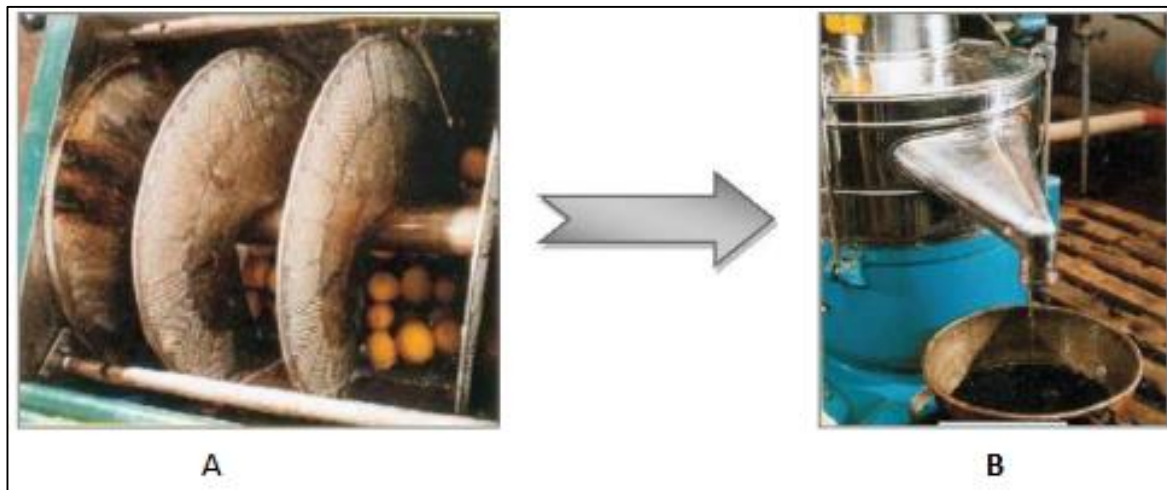


Figure 6 : Expression à froid de l'essence de *Citrus* Bousbia (2011)

A : Pelatrice

B : centrifugeuse

3.2 Les méthodes non conventionnelles d'extraction des huiles essentielles

Aux méthodes classiques suscitées peuvent substituer d'autres méthodes d'extraction récentes

3.2.1 Extraction par les gaz supercritiques

C'est un procédé dans lequel sont utilisés des fluides sous des conditions spéciales de température et de pression, un état dit supercritique intermédiaire entre liquide et gaz pour extraire les composants contenus dans les végétaux qui permet d'avoir un très bon pouvoir solvant et une meilleure diffusibilité dans les matières solides. Souvent le gaz utilisé est le CO₂ (Pellerin, 1991)

Selon Pellerin (1991), le CO₂ supercritique est un solvant idéal. Il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus mais aussi par sa disponibilité chimiquement inerte, chimiquement inerte, inflammable, non toxique, sélectif, peu coûteux et naturel. De plus aucun réarrangement ne s'opère lors du

processus. Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité mais à un coût d'installation très élevé.

3.2.2 Extraction par micro-ondes

L'extraction par micro-ondes est une technique qui permet l'extraction des huiles essentielles sans ajout de solvant organique ou d'eau. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes, dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Contrairement à un chauffage classique, le dégagement de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur. Cette chaleur va créer à l'intérieur des glandes oléifères une pression qui va briser les parois végétales et libérer ainsi l'huile (Figure 7).

Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide de procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation.

Ce procédé présente beaucoup d'avantages comme le gain de temps l'économie d'énergie tout en réduisant les coûts et améliorent le rendement (Damyeh *et al.*, 2016, Xiao *et al.*, 2023) ce qui en fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études. (Dorosso,2002).

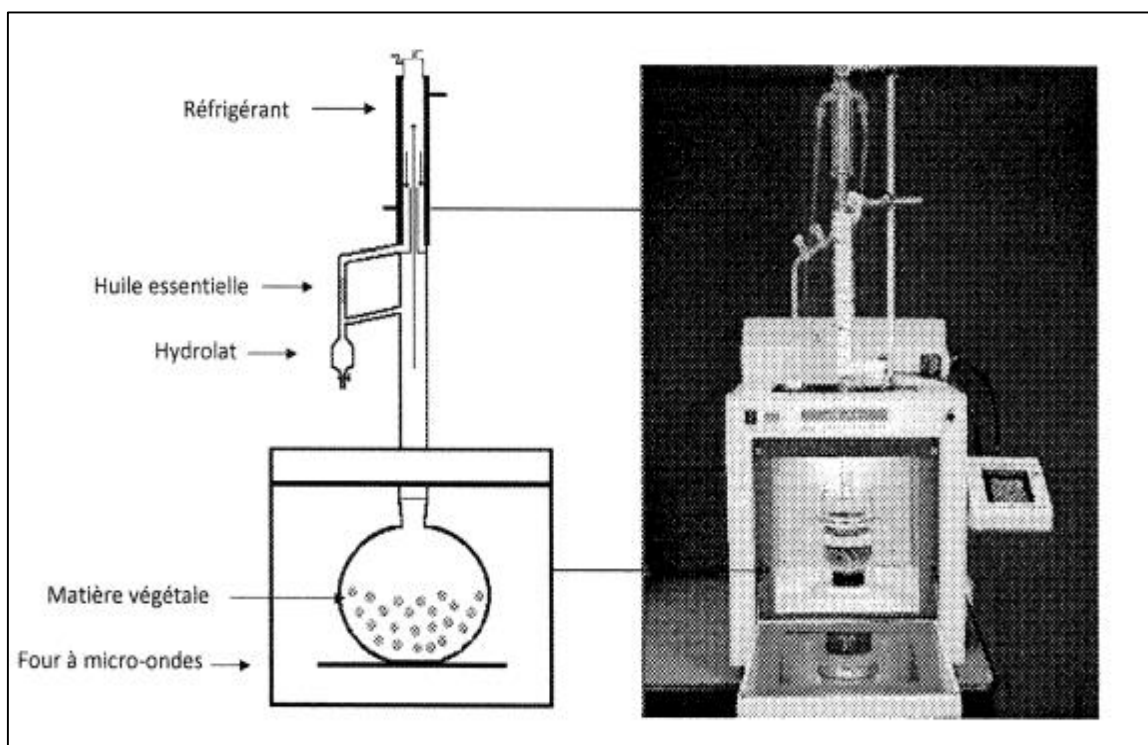


Figure 7: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (Lucchesi *et al.*, 2007)

4. Importance des huiles essentielles en phytothérapie

Les huiles essentielles contiennent un Intérêt thérapeutique elles présentent différentes. Elles sont utilisées en pharmacie comme principe actif et à des fins d'aromatisation, les huiles essentielles peuvent être utilisées comme anti infectieux, anti oxydant, antiseptique et analgésique.

4.1. Pouvoir Antibactériens

Les HES ont une double action contre les microbes : effet bactéricide et bactériostatique. Plusieurs travaux montrent que les HE et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Carson et Riley, 1995).

4.2. Pouvoir Antivirales

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques contenues dans les HES, ce qui confère à ces dernières la capacité de combattre certaines pathologies virales. Les HES stimulent le système immunitaire tout en facilitant l'élimination du mucus et arrêtant le développement des virus (Moroburongo,2008). Parmi les HES qui peuvent être des antivirales l'HE de Ravintsara (Zahalika, 2010).

4.3. Pouvoir anti oxydant

La recherche sur les anti-oxydant naturels a suscité beaucoup d'intérêt. Les HES ont été étudiées pour leurs propriétés anti oxydantes, considérées comme des ressources potentielles de molécules bioactives naturelles contenant des composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol ayant une fortes activités anti oxydantes ainsi que d'autres composés qui contribuent à cette activité tels que les mono terpènes alcools cétones, aldéhydes, hydrocarbures et éthers (Gabriel *et al.*2013).

4.4. Pouvoir antiseptique

Les huiles essentielles ont un pouvoir antiseptique inhibant le développement de la bactérie, plusieurs études ont montré que les HES peuvent arrêter des microbes les plus puissant comme les staphylocoques les bacilles de Koch ...etc., Leurs pouvoir n'est pas affecté par le temps et reste constant.

4.5. Pouvoir Anti-inflammatoire

Les aldéhydes contenus dans les huiles essentielles ont des propriétés actives contre anti-inflammatoire comme l'HE de Gingembre (Moroburongo,2008).

4.6. Pouvoir anti déresseur

Il a été constaté que l'inhalation d'huile de lavande pendant 3 minutes chaque jour pendant trois jours entraînait une diminution de la dépression et une sensation de calme chez les adultes en bonne santé. En outre, lorsque des patients déprimés diagnostiqués, souffrant d'agitation psychomotrice, d'insomnie et d'anxiété, ont reçu des capsules d'huile de lavande pendant trois semaines, l'anxiété, les troubles du sommeil et l'agitation psychomotrice ont été réduits de manière significative. (Fiβler *et al* 2014)

5. Rôles Physiologiques des huiles essentielles

Le rôle précis des huiles essentielles dans la physiologie des plantes productrices demeure encore partiellement énigmatique, bien que diverses théories aient été avancées à ce sujet. Les huiles essentielles sont définies comme des signaux moléculaires réagissant aux interactions écologiques entre les plantes et leur milieu environnant. La complexité intrinsèque de ces composés leur confère la capacité de transmettre différents messages biologiques spécifiques. Du fait de leur volatilité, les composants des huiles essentielles sont en mesure d'influencer des organismes situés à une certaine distance de la plante émettrice. Leur nature lipophile leur confère une certaine persistance au sein de l'environnement, principalement aqueux. Des études ont démontré que les huiles essentielles exercent une action répulsive envers les herbivores (Isman, 2000). Des effets attraction sur les animaux contribuant à la pollinisation (Ciccarelli *et al.*, 2008) ainsi qu'à la dispersion des graines a également été observée Par ailleurs, les plantes aromatiques tirent profit des huiles essentielles pour entraver la germination et le développement d'autres espèces végétales dans leur environnement, démontrant ainsi un effet allélopathique (De Feo *et al.*, 2002).

Chapitre II

Monographies des plantes étudiées

1. Le Pin d'Alep

1.1. Généralités

Quezel et Santa (1963) ont caractérisé le pin d'Alep en tant qu'espèce qui colonise les forêts de montagne, telles que celles à Tikjda dans le massif du Djurdjura. Les feuilles se distinguent par leur teinte verte foncé et mesurent généralement de 10 à 16 cm de long, avec une certaine rigidité. Les jeunes pousses présentent des nuances jaunes ou oranges, tandis que les cônes affichent une longueur de 5 à 7 cm, avec des écailles dotées d'une excroissance bombée et d'une carène transversale pointue. Les graines, quant à elles, arborent une couleur brune tachetée de noir.

1.2. La classification de Pin d'Alep

Le Pin d'Alep est une espèce du genre *Pinus*, et du sous-groupe *halepensis*. Ce groupe est essentiellement représenté par deux espèces *Pinus halepensis* Mill et *Pinus brutia* Ten appartenant exclusivement au circum méditerranéen (Quézel et Médail, 2003).

Selon Nihal (1962) le Pin d'Alep "*Pinus halepensis* Mill." est l'essence caractéristique de l'étage bioclimatique méditerranéen semi-aride, il appartient à :



Règne : Plantae

Embranchement : Phanérogames

Sous embranchement : Gymnospermes.

Classe : Conifères.

Ordre : Coniferales pinoidines.

Sous ordre : Abiétales.

Famille : Pinacées.

Genre : *Pinus*.

Sous genre : *Eupinus*.

Espèce : *Pinus halepensis* Mill.

Figure 8 : individu adulte de pin d'Alep (*Pinus halepensis*) (Original 2023).

1.3. Caractéristiques botaniques

C'est un arbre forestier résineux de taille atteignant parfois 30 mètres de haut, souvent incliné et peu rectiligne, à canopée aplatie, inégale et évidente mais ses rameaux sont assez répandus. Persistant, vivace, au tronc sinueux, à l'écorce d'abord lisse et grise, puis épaissie et fissurée virant au brun rougeâtre avec le temps. Les jeunes arbres ont une forme assez régulière, les vieux arbres sont inertes, la cime est plus dispersée, inégalement clairsemée couronne. (Boutchich et Boutrigue, 2016)

Aiguille fine, souple, coupée en deux, de 5 à 10 cm de long, de couleur vert jaunâtre. Le pin d'Alep est une plante à fleurs mâles et femelles séparées (monoïque) situées sur le même individu portant deux types d'inflorescence : des cônes mâles de couleur jaune teintée de rouge et des cônes femelles pédonculés roses et violacés. C'est un arbre qui fructifie très tôt à partir de 10 à 12 ans, mais les graines ne sont fertiles qu'à partir de 18 à 20 ans. La fructification a lieu en été et en automne de l'année suivante après fécondation (Rameau *et al.*, 2008)

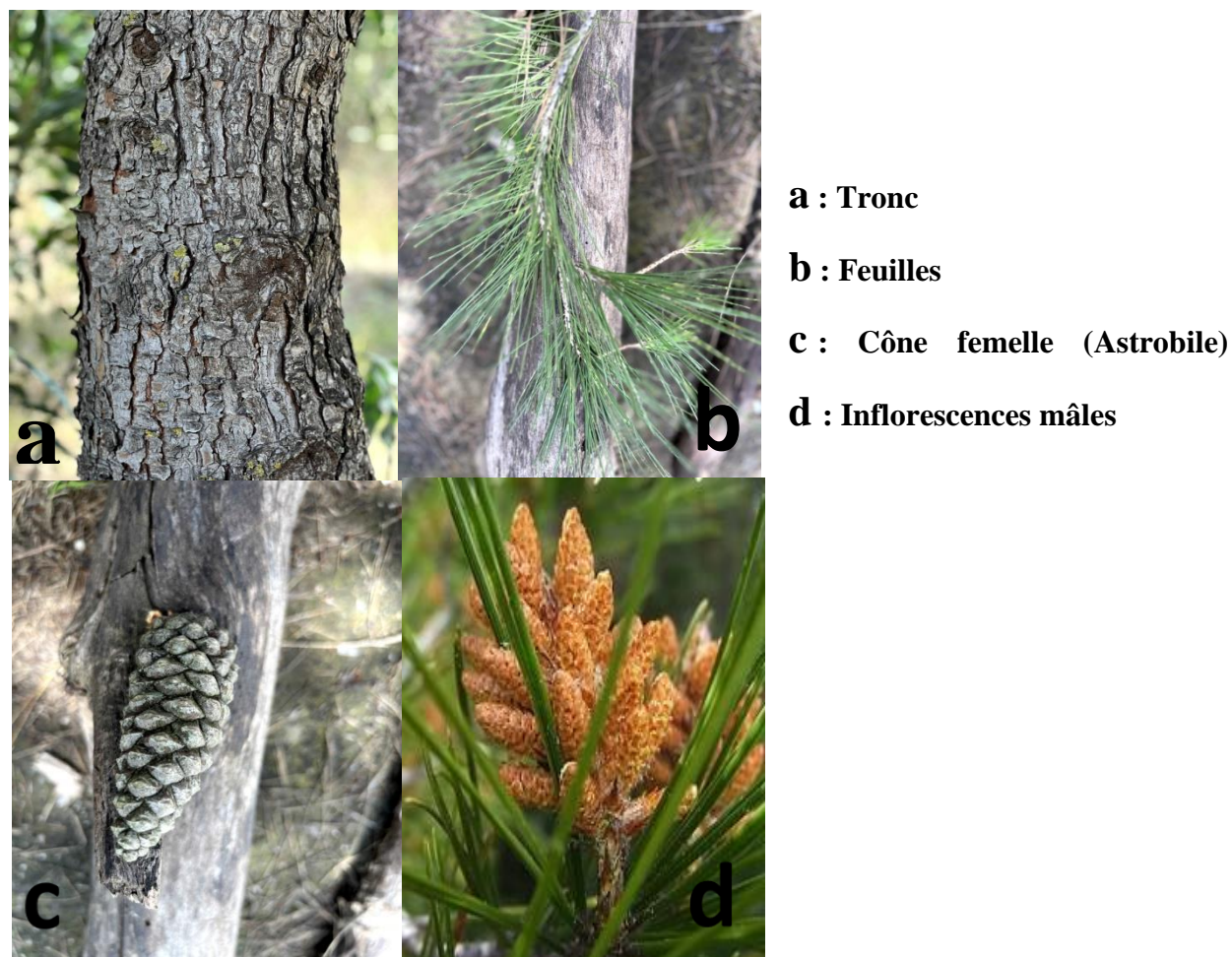


Figure 9 : Caractéristiques botanique de *Pinus halpensis* (original 2023).

1.4. Répartition du pin d'Alep en Algérie

le pin d'Alep est largement répandu principalement dans les massifs du tell littoral et l'Atlas saharien. Il couvre une superficie d'environ 850 000 hectares, ce qui représente 37% de la surface boisée réelle du pays. D'après Boudy (1955), le pin d'Alep forme de vastes peuplements notamment dans l'oranaïs (Sidi-Bel-Abbès, Saida, Tlemcen, Tiaret), dans l'Algérois (média, Boghar, Monts des Bibans), sur l'Atlas saharien (mont de Ouled Nail) et dans le sud Constantinois (Aurès, région de Tébessa), (Zenzen,2016).

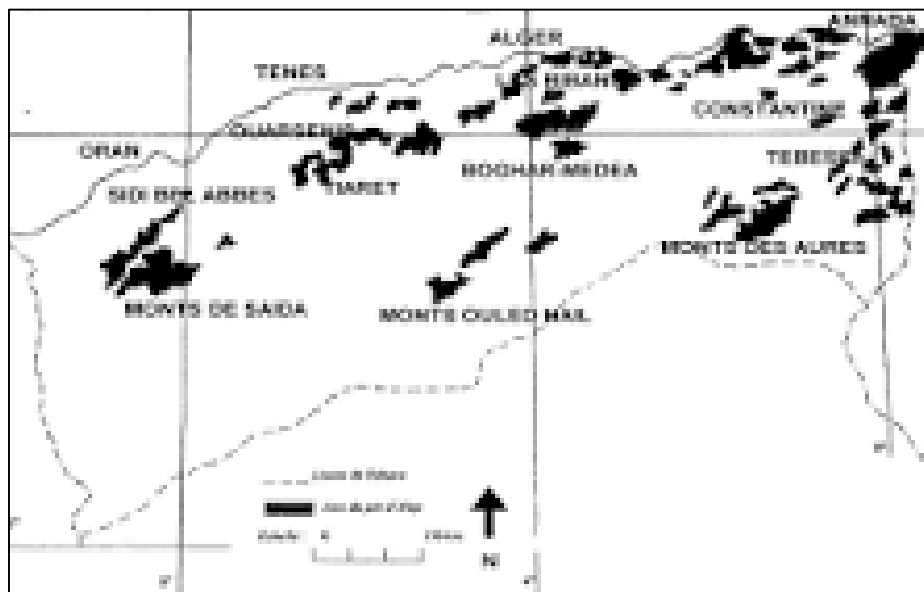


Figure 10 : Aire de répartition du pin d'Alep en Algérie (seigue,1985)

2. Le Géranium (*Pélargonium roseum*)

2.1. Présentation de la famille des Géraniacées (*Geraniaceae*)

La famille des Geraniaceae, également connue sous le nom de Géraniacées, constitue un groupe de plantes dicotylédones authentiques, englobant de 5 à 7 genres et comptant entre 650 et 800 espèces. Parmi ces genres, Géranium et Pélargonium font partie de la famille des Géraniacées et présentent une similitude dans leur fruit allongé, composé de cinq méricarpes, chacun renfermant une unique graine (Miller, 2002).

2.2. Caractéristiques botaniques

Cet arbuste de taille modeste se dresse avec une posture érigée, montrant une ramification abondante qui s'étend pour former un amas pouvant atteindre 1,3 mètre en hauteur et 1 mètre en diamètre. La tige herbacée, initialement verte, tend à se brunir et à s'épaissir en bois avec le temps. Ses ramifications axillaires, élancées ou s'étendant, contribuent à créer une apparence de touffe compacte à l'ensemble de la plante. Les feuilles, de teinte verte, possèdent une texture

relativement douce au toucher et sont toujours pourvues d'une abondance de poils sur leur surface, donnant un aspect velouté. Elles sont disposées de manière opposée sur la tige, exhalant un parfum caractéristique, et présentent une découpe en 5 à 7 lobes. La structure florale se trouve à l'extrémité des tiges, constituée de 3 à 10 semi-ombelles arborant une teinte rose. Les fleurs elles-mêmes, dotées de cinq pétales, exhibent souvent des veines d'une nuance plus sombre (Demarne ,1992).



Figure 11 : *Géranium rosat* (original 2023).

2.3. Répartition en Algérie

Au cours du 19^{ème} siècle, *P. graveolens* fait son entrée en Algérie et trouve son lieu de culture privilégié dans la plaine de Mitidja, où elle est principalement cultivée dans les jardins et les cimetières (Demarne ,1992).

2.4. Classification phylogénétique

D'après la classification phylogénétique établie par Ceonquist (1981), la catégorisation du géranium se présente de la manière suivante :

Règne : Plantae (Plantes)

Super division : Spermatophyta (plantes à graines)

Division : Magnoliophyta (ou angiospermes), plantes à fleurs

Classe : Magnoliopsida (ou Dicotylédones)

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Geraniales

Famille : Geraniaceae

Genre : *Pelargonium*

Espèce : *Pelargonium roseum*

Chapitre III

Matériel et méthodes

1. Localisation de la zone d'étude

Les feuilles et les tiges de *Pelargonium roseum* et du *Pinus halpensis* ont été prélevées dans la Wilaya de Tizi-Ouzou précisément au village Oumaden commune d'Ath Zmenzer situé à une altitude de 510 m (figure 12).

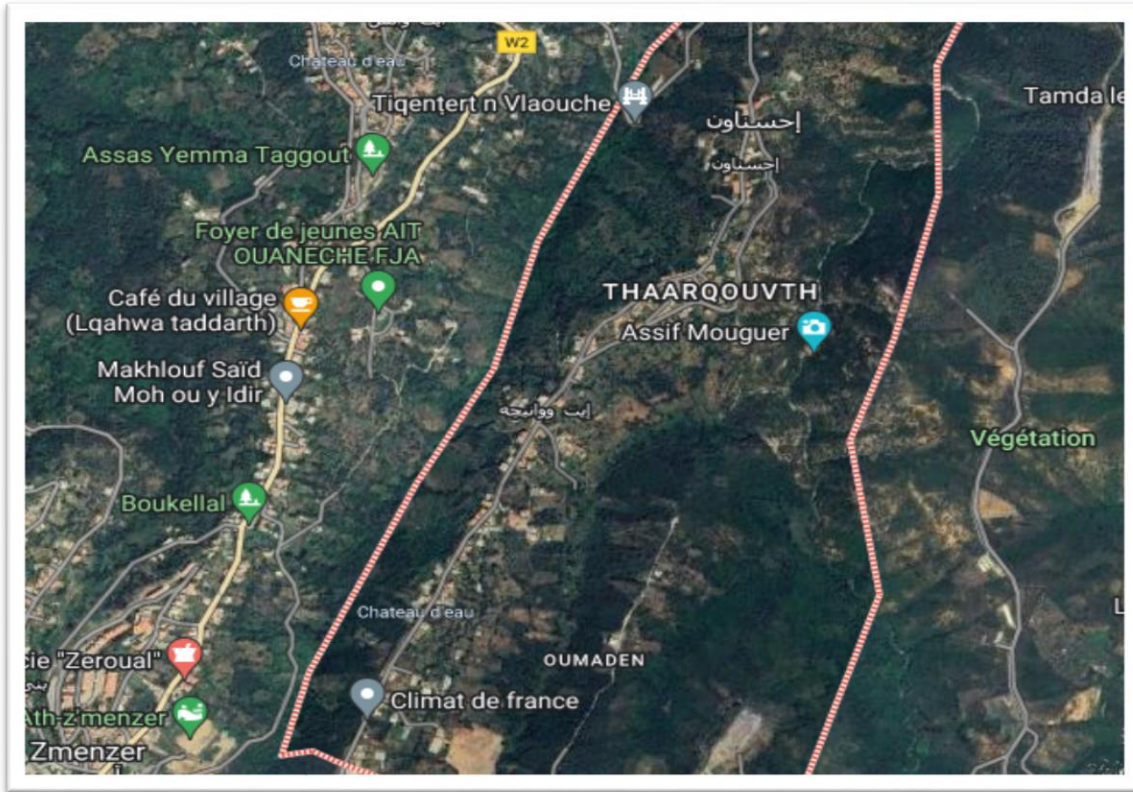


Figure 12 : Localisation du site de prélèvement des plantes étudiées (Google map).

2. Réalisation de coupes anatomiques pour l'étude des structures sécrétrices d'huiles essentielles à la microscopie optique

L'analyse histologique de deux espèces implique la réalisation de sections anatomiques au niveau des organes tels que les feuilles, les tiges ou les pétioles, en utilisant la méthode préconisée par Deyson (1954).

2.1. Réalisation des coupes anatomiques

Afin de produire des sections anatomiques délicates, nous avons employé les organes frais de chaque plante étudiée, incluant les feuilles, les tiges et les pétioles. Ces organes ont été insérés entre deux morceaux de polystyrène expansé, maintenus en place à l'aide d'une lame de rasoir, permettant ainsi la réalisation rapide de coupes perpendiculaires à l'axe de l'organe. Par la suite, les coupes ont été récupérées et placées dans une boîte de Pétri contenant de l'eau distillée.

2.2. La double coloration

Les coupes sont placées dans l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) pendant une période de 10 à 20 minutes, ce qui permet de débarrasser les cellules de leur contenu. Ensuite, elles ont subi un rinçage abondant à l'eau. Par la suite, elles sont rapidement rincées dans de l'acide acétique dilué afin de neutraliser tout excès d'eau de Javel, puis elles sont de nouveau rincées à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite soumises à l'action du rouge Congo pendant une durée de 15 à 20 minutes, suivie d'un rinçage, puis elles sont plongées dans un bain de vert de méthyle pendant 10 à 15 minutes. Après un dernier rinçage à l'eau, les coupes sont observées au microscope optique.

3. Extraction des huiles essentielles à partir des fleurs de *Pelargonium roseum* et des pseudophylles de *Pinus halepensis*

Dans une première étape, l'extraction a été réalisée avec 2 kg de fleurs de *Pelargonium roseum* dans un extracteur pilote de type alambic (voir figure 13). Ensuite, l'extraction à partir des pseudophylles de pin d'Alep a été faite dans ce même extracteur.

L'Alambic est formé :

- ✓ D'une chaudière
- ✓ D'une corbeille
- ✓ D'un réfrigérant
- ✓ Un essencier (platine)

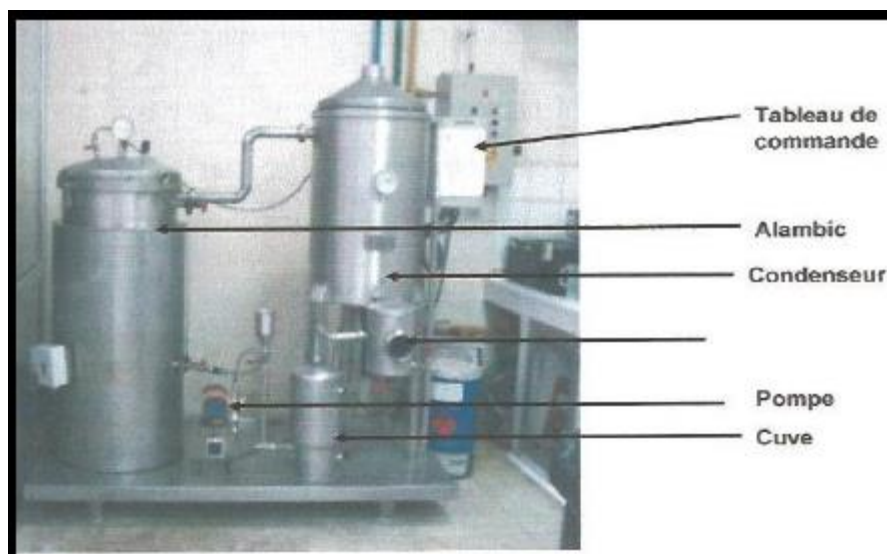


Figure 13 : Extracteur pilote (Taleb, 2015).

La chaudière est conçue pour accueillir la corbeille contenant la matière végétale à distiller. Une fois que de l'eau est ajoutée à la chaudière, la matière végétale est placée dans la corbeille. La température de l'extracteur est maintenue à 100 °C pour favoriser l'évaporation de l'eau et l'entraînement des molécules d'huile essentielle sous forme gazeuse (vapeur).

La vapeur ainsi produite se dirige depuis la chaudière vers le réfrigérant, un tube en métal inoxydable qui est connecté au serpentin du réfrigérant, rempli d'eau et maintenu à une température d'environ 12-13°C. Cette température entraîne la condensation de la vapeur en gouttelettes, lesquelles sont récupérées dans l'essencier. Comme l'huile essentielle est généralement moins dense que l'eau, elle se sépare naturellement.

Ensuite, l'eau est évacuée en ouvrant le robinet de l'essencier. L'huile essentielle ainsi que la petite quantité d'eau résiduelle sont recueillies dans une ampoule à décanter. Cette opération a nécessité environ 2 heures. Enfin, l'huile essentielle est transférée dans un flacon en verre foncé et conservée au réfrigérateur 4°C.



Figure 15 : Huile essentielle de Géranium rosat
(originale 2023)



Figure 14 : Huile essentielle de Pin d'Alep
(originale 2023).

3.1. Détermination du taux d'humidité du matériel végétal

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais sont mesurés à l'aide de l'appareil de DEAN et STARK.

Il est formé d'un ballon en verre relié à un tube de raccordement qui le lie à un tube cylindrique gradué le tube cylindrique est surmonté d'un réfrigérant, le ballon est placé sur le chauffe ballon. Le principe est de quantifier l'eau contenue dans le végétal en le mettant en contact d'un solvant (le toluène), le tout est porté à ébullition.

Dans le ballon, un poids P de matière végétale est mélangé à un volume (100 ml) de toluène. Sous l'effet du chauffage le solvant ainsi que l'eau dans le végétal s'évaporent. Une fois dans le réfrigérant, la vapeur se condense en gouttelettes qui s'accumulent dans le tube gradué (eau à la base, le solvant en haut) L'opération dure jusqu'au moment où le niveau d'eau dans le tube gradué devient stable et le solvant limpide.

A la fin de l'opération, l'intensité de chauffage est augmentée afin de récupérer toutes les gouttelettes d'eau déposées sur les parois du réfrigérant.

Après refroidissement le volume d'eau est lu sur le tube gradué et le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

Avec :

H : taux d'humidité.

V : le volume d'eau

M : masse de matériel végétal.

$$H = \frac{M}{V} \times 100$$

3.2. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement est la quantité maximale d'huile essentielle que fournit une masse donnée de végétal pendant une période donnée. Le rendement est calculé par la formule :

Avec :

R : Rendement en huile essentielle en pourcentage (%)

V : volume de l'huile (ml) recueilli

MS : Matière Sèche (g)

$$R(\%) = \frac{V}{MS} \times 100$$

4. Evaluation de l'effet des huiles essentielles sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*

4.1. Souches bactériennes

Dans cette étude deux souches bactériennes ont été choisies dont une à gram positif qui est *Staphylococcus aureus* et l'autre à gram négatif qui est *Escherichia coli* issu de la collection des souches référencées du laboratoire de microbiologie du département de biologie de l'UMMTO.

4.2. Revivification microbiologique des souches microbiennes

L'utilisation du milieu de culture BHIB (bouillon cœur cerveau) afin de revivifier les souches bactériennes testées pour les employer, un repiquage dans des tubes contenant du BHIB a été effectué à partir des milieux de conservation des souches, ces tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

4.3. Repiquage sur les milieux sélectifs

Les souches bactériennes testées ont été repiquées à partir des cultures contenues dans le BHIB sur les milieux sélectifs, suivies d'une incubation à 37°C pendant 24h.

4.4. Préparation de la suspension bactérienne (l'inoculum)

A l'aide d'une anse platine stérile, prélever 3 à 4 colonies bactériennes bien isolées de chaque espèce étudiée à partir des boîtes de Pétri ensemencées précédemment puis déposer les colonies dans 9ml d'eau physiologique stérile (0,9% chlorure de sodium (Na Cl)). Ces tubes sont ensuite vortexés pendant quelques secondes. Une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5W de MC Ferland (10^8 UFC.ml⁻¹) est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm et la densité optique est ajustée à 0,08 – 0,10. L'ajustement de l'inoculum bactérien se fait en fonction de la charge : Soit par ajout de la culture si la DO est faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop chargé.

4.5. Méthode de diffusion

La méthode des aromatogrammes (Figure16) est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle testée. Cette méthode consiste à déposer un disque stérile imbibé d'HE sur un milieu solide dans une boîte de pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien d'HE sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis à vis de cette HE.

La méthode de diffusion sur disque appliquée est celle décrite par Hayes et Markovic (2002). Environ 20 ml de Muller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri.

Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne (10^8 UFC/ml⁻¹) testée est étalée en surface. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, 4 disques de papier filtre stérile de 6mm de diamètre sont déposés sur l'Agar, dont 2 disques imprégnés parallèlement avec des concentrations d'HE (5µl, 10µl et 15µl). 2 disques témoins sont réalisés. Il consiste en : un témoin positif par dépôt de disque antibiotique (Gentamycine) et un témoin négatif imprégné avec 5ml d'eau physiologique stérile, les boîtes ont été incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre.

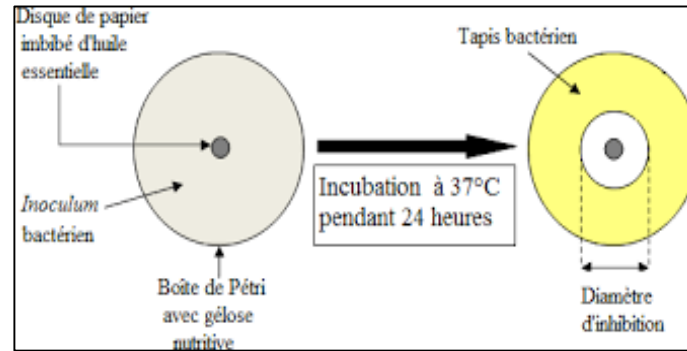


Figure 16 : Méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (Ouaar, 2018).

4.6. Détermination de la CMI par la méthode de microplaque à 96 puits

Cette étape a été accomplie en utilisant une plaque de culture à 96 puits. Le procédé consiste à ensemer une série de 11 concentrations décroissantes d'HE à partir d'un inoculum standardisé. Chaque puits contient 40 µl de bouillon Muller Hinton, et dans le premier puits de chaque rangée, 15 µl d'HE sont ajoutés, suivis de dilutions successives avec un facteur de 1/2, du premier au onzième puits de chaque rangée, à l'exception du douzième puits. Ensuite, 5 µl de suspension bactérienne à une concentration de (10^8 UFC/ml⁻¹) sont ajoutés à chaque puits. La plaque ainsi préparée est placée dans une étuve pour incuber pendant 18 à 24 heures. L'observation de la série permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice, correspondant à la plus faible concentration d'HE capable d'empêcher la croissance bactérienne.

4.7 Analyse statistique des résultats obtenus

Pour Comparer le rendement des rayons d'inhibition des huiles essentielles pour cella l'analyse Anova a été utiliser, cette dernière a été faite grâce au logiciel d'analyse R.software(Version4.1.0).

Chapitre VI

Résultats et discussion

1. Rendement en huiles essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale fraîche de la partie aérienne de la plante.

Les taux d'humidité ainsi que les rendements obtenus pour les deux espèces de plantes étudiées sont rassemblés dans le (tableau 1).

Tableau 1 : Taux d'humidité et des rendements en huiles essentielles.

Espèces	Masse utilisée (g)	Taux d'humidité (%)	Rendement (ml)
<i>Pinus halepensis</i>	30,3212	3,29	0,5
<i>Péargonium roseum</i>	12,0015	8,16	0,6

2. Étude histoanatomique

L'observation des coupes histoanatomiques réalisées à partir des feuilles, tiges et pétioles de *Pelargonium roseum* a permis de localiser les sites sécréteurs des essences végétales.

2.1. La feuille de géranium roseum

L'observation au microscope optique de la coupe transversale de la feuille de *Pelargonium roseum* montre la présence de tous les caractères d'une feuille de Dicotylédones comme le montre la figure 17.

La présence de poils tecteurs variés : unicellulaires, bicellulaires et tri cellulaires à extrémités effilées et fines de taille variable (courte, moyenne et longue). La présence de poils sécréteurs à tête pluricellulaire et pied unicellulaire.

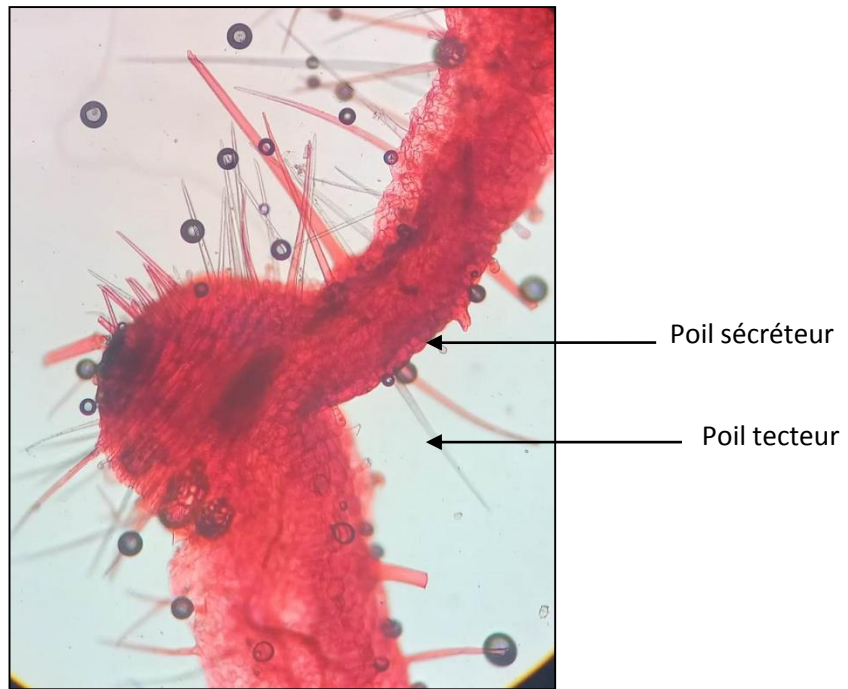


Figure 17 : Coupe transversale de la feuille de *Pelargonium roseum* (G 10X10).

2.2. La tige de *Geranium roseum*

La section transversale effectuée sur la tige de *Pelargonium roseum* (Figure 18) présente des similitudes avec les caractéristiques typiques des tiges des plantes dicotylédones, comprenant la présence de poils protecteurs et sécréteurs, bien que leur nombre soit moins élevé par rapport à celui observé dans les feuilles.

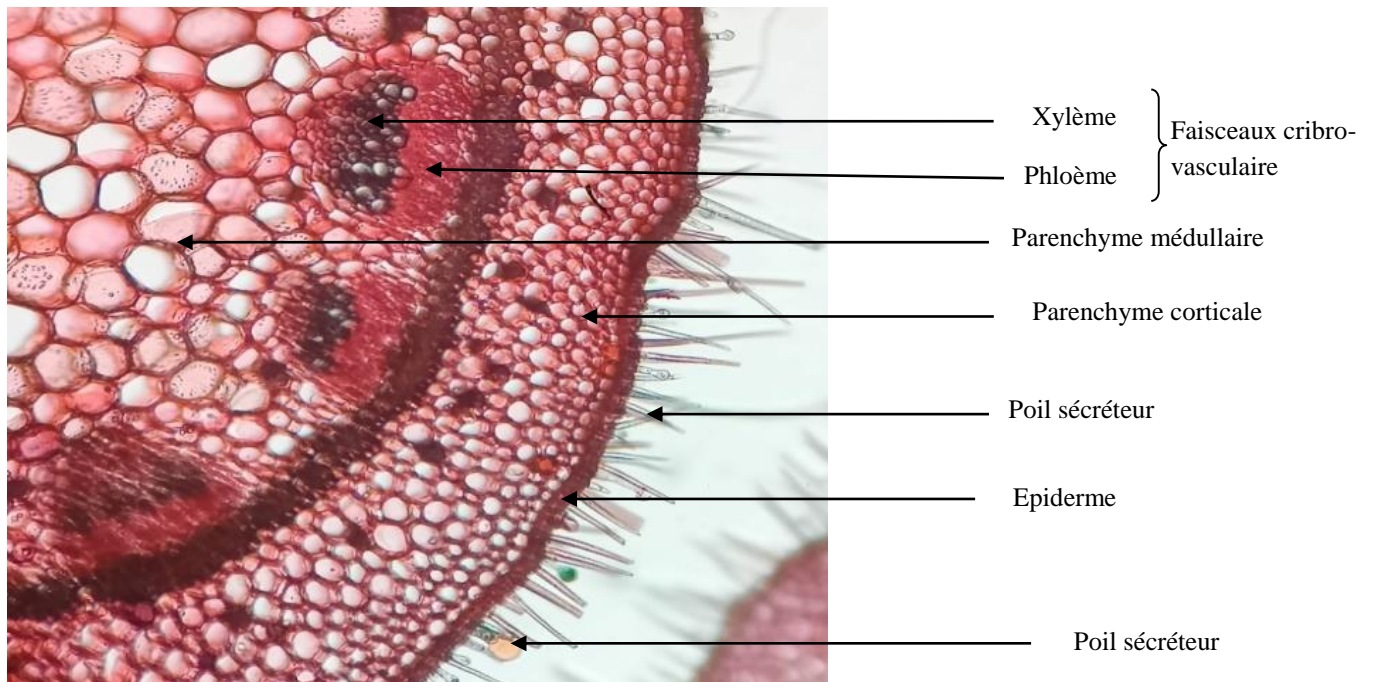


Figure 18 : Coupe anatomique de la tige de *Pelargonium roseum* (MO : Gx40).

De plus, on distingue également :

- Epiderme : représenté par une seule assise de petites cellules à paroi cellulósiques allongées.
- Parenchyme cortical : formé par plusieurs couches de cellules à paroi mince et pectocellulosiques allongées.
- Xylème : situées vers l'intérieur, ces cellules sont mortes, leur paroi est partiellement lignifiée, elles sont superposées par rapport au phloème, comportant des vaisseaux de différents types. Leur rôle principal est la conduction de la sève brute.
- Une structure secondaire : xylème et phloème secondaires.
- Parenchyme médullaire formé de cellules à paroi mince et de forme très variable. Il est situé profondément dans l'organe.

2.3. Structures sécrétrices

Chez *Pelargonium roseum*, l'huile essentielle est stockée dans des poils sécrétrices aussi bien au niveau de la feuille que de la tige. Comme tous les poils sécrétrices, on note une tête arrondie dans laquelle s'accumule l'essence et un pied qui la relie à l'épiderme. (Figure 19)

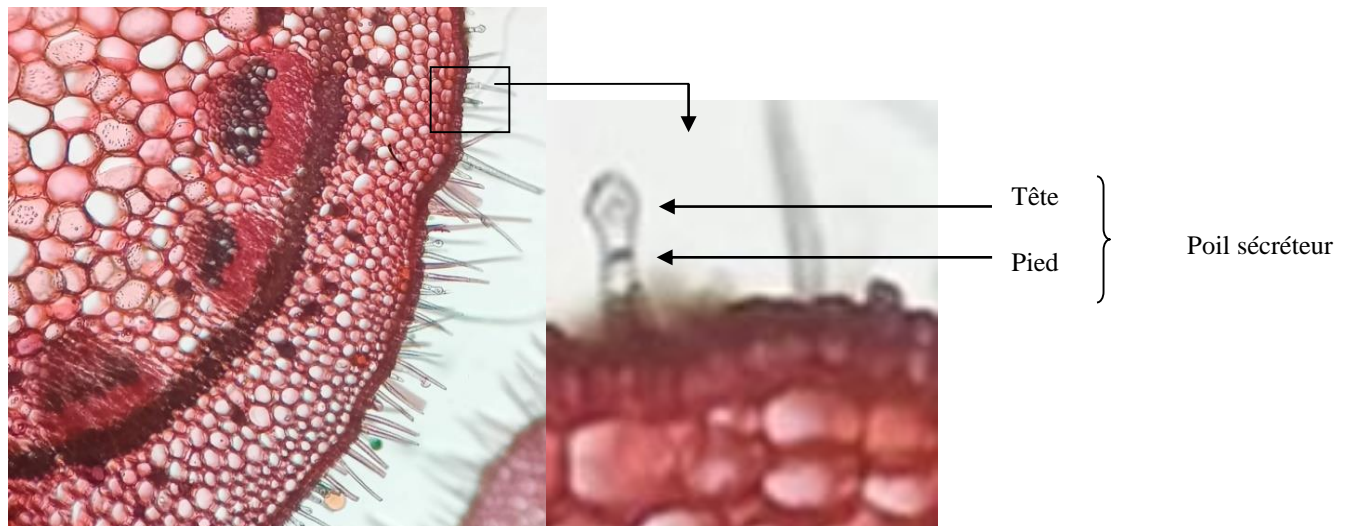


Figure 19 : Observation microscopique d'un poil sécréteur de *Pelargonium roseum* (M.O: Gx40).

2.4. La tige de pin d'Alep

Dans la coupe transversale d'une pseudophylle, nous avons observé une structure normale avec : une assise épidermique continue, un mésophylle (parenchyme chlorophyllien) présentant de la chlorophylle sur toute sa surface, une assise de cellules formant une gaine protectrice, des stomates, des canaux résinifères et des faisceaux libéro-ligneux. (Figure 20.)

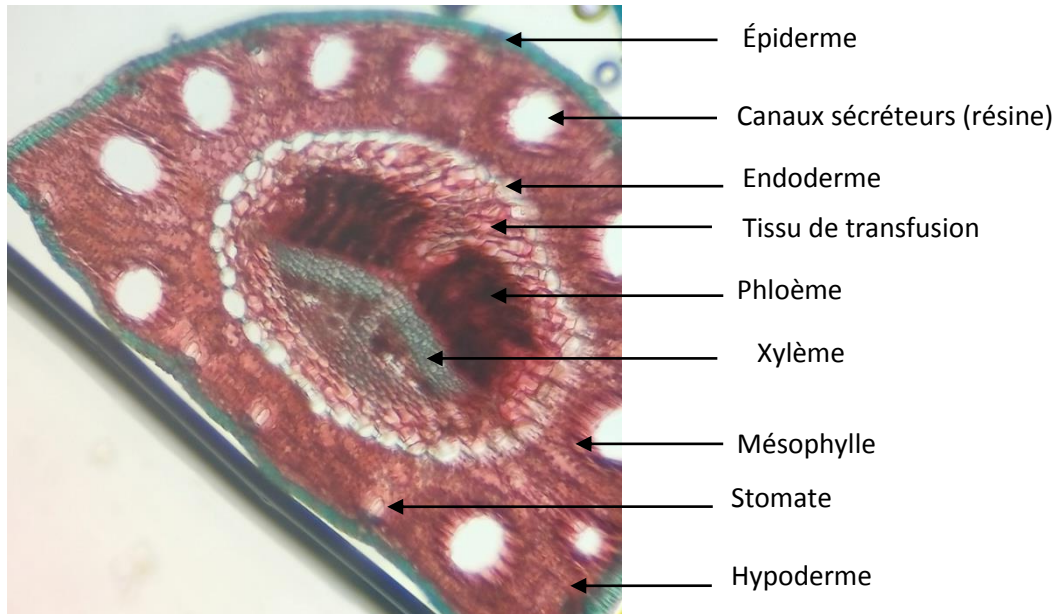


Figure 20 : Coupe transversale de la feuille de Pin d'Alep (MO : G10).

3. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

3.1. Technique de l'antibioaromatogramme

Le pouvoir antibactérien des HEs de *Pinus halepensis* et *Pelargonium roseum* vis-à-vis des bactéries *S.aureus* et *E. coli* a été évalué par la présence ou l'absence des zones d'inhibition après 24h d'incubation à 37 °C (figure 21).



Figure 21 : Etude de l'effet des huiles essentielles sur la croissance bactérienne par la technique de l'antibioaromatogramme.

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés en présence des HEs et obtenu après 24h d'incubation sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pelargonium roseum* et *Pinus halepensis* et pin d'Alep exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en Cm.

Huile	Souche bactérienne	Dose en µl			
		SUS	5µL	10 µL	15 µL
Pin d'Alep	<i>E. coli</i>	HE (R1)	1	1,8	2
		HE (R2)	1,4	2	1
		AB	1.8	2	2
		AB	1.2	1.6	1.7
		EP	0	0	0
		EP	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	HE (R1)	3	1,4	1,8
		HE (R2)	1,5	2.2	1.5
		AB	3	3.5	2.2
		AB	2.7	3	3.7
		EP	0	0	0
		EP	0	0	0
Géranium Rosat	<i>E. coli</i>	HE (R1)	1	2.2	NA
		HE (R2)	2	2	NA
		AB	1.2	1.6	NA
		AB	1.8	1.6	NA
		EP	0	0	0
		EP	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	HE (R1)	1,3	2.4	NA
		HE(R2)	1	2	NA
		AB	2.1	2.8	NA
		AB	2	1.8	NA
		EP	0	0	0
		EP	0	0	0

NA : Résultats illisible

AB : Antibiotique (témoin positif)

EP : Eau physiologique (témoin négatif)

3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de *Géranium roseum* et de pin d'Alep a été déterminée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. Les valeurs des CMI sont interprétées à partir de la microplaque à 96 puits, illustrée par la figure 22 et répertoriées dans le tableau 3.

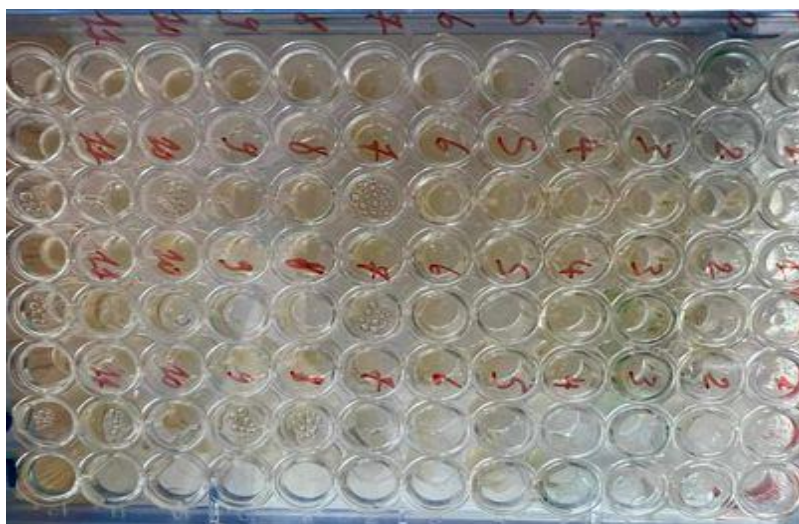


Figure22 : Microplaque a 96 puits

Tableau 3 : Détermination des CMI des huiles essentielles de géranium et pin d’Alep.

Huile essentielle	Bactérie	15 µl	7,5 µl	3,75 µl	1,88 µl	0,94 µl	0,47 µl	0,23 µl	0,12 µl	0,059 µl	0,029 µl	0,015 µl
<i>Pinus halepensis</i>	<i>E.coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pélargonium roseum</i>	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>S.aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : croissance – : absence de croissance

4. Discussion :

La qualité des huiles essentielles peut varier selon le taux de l'humidité (Robin,2017). Dans notre étude nous avons obtenu un taux d'humidité égale à 0,03 pour le pin d'Alep et pour le géranium égale à 0,081. Ceci pourrait être expliqué par la méthode choisie pour l'extraction d'huile essentielle ce qui présente l'inconvénient de laisser des traces d'eau, lors de la récupération (Benhabiles, 1995).

A partir de la plante fraîche de géranium nous avons obtenu un rendement élevé en huile essentielle (0.6 %). Ce rendement est largement supérieur à celui rapportés par Boukhatem *et al.* (2010) obtenu à partir de géranium rosat issue de la région de Chiffa (w. Blida), en pleine floraison durant le mois de mai 2008 égale à 0,2%. Mais aussi aux résultats des études antérieures et aux normes fixées par AFNOR (0.15%).

En comparaison avec d'autres régions, le rendement est remarquablement élevé pour le géranium séché provenant du Maroc récolté en mars 2013 (wootton-beard *et al.*, 2011). Il atteint un taux de 0,8%, qui est largement supérieur à notre rendement.

A partir de la plante fraîche de pin d'Alep, nous avons obtenu un rendement avoisinant les 0,5% d'HE .Nous notons que nos résultats s'accordent aux rendement de l'huile essentielle de la même espèce récoltée dans la région de Sidi Fredj en Algérie,qui est de 0,52% (Dob *et al.*,2005). Cependant, ce rendement est relativement faible comparé à celui rapporté par Sadou *et al.*(2015) obtenu à partir des aiguilles de *P. halepensis* sèches issues de deux sites : le parc national d'El kala et la forêt Zaarouria récoltées au printemps par entrainement à la vapeur d'eau qui sont des rendements respectifs de 0,81% du site 1 et du site 2 qui est de 0,3%.

La variation du rendement est probablement due à l'origine génétique et aux facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité relative, la saison de récolte, et la fraîcheur de la plante au moment de l'extraction. De plus, la méthode d'extraction, la durée totale d'insolation, et le régime des vents exercent une influence directe sur le rendement, en particulier chez les espèces végétales qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles, à l'instar des pélargoniums odorants. Tous ces éléments doivent être pris en considération lors de la cultivation et de l'extraction des composés d'intérêt à partir de ces plantes (Guignard ,1983).

Les résultats de l'analyse de la variance relatifs à notre bio-essai ont montré que les huiles essentielles de géranium (*Pelargonium roseum*) et Pin d'Alep (*Pinus halepensis*) ont affecté la croissance des deux bactéries pathogènes utilisées *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Ils indiquent une différence très hautement significative pour le facteur substance ($DDL = 2$, $F = 87.5176$; $P = 0.001$) une différence hautement significative pour le facteur espèce bactérienne ($DDL = 1$; $F = 13.5501$; $P = 0,001$) et une différence hautement significative pour l'interaction espèce bactérienne X HE ($DDL = 2$; $F = 6,5745$; $P = 0,001$). Ces résultats ont été révélés par l'huile essentielle de pin d'Alep.

L'huile essentielle de géranium, une différence très hautement significative a été montrée aussi bien pour le facteur substance ($DDL=2$; $F= 78,23$ et $P=0,001$) que pour le facteur dose ($DDL=2$, $F=82,4662$ et $P= 0,001$) et pour l'interaction espèce substance dose ($DDL=4$; $F=22,116$ et $P=0,001$).

Les bio-essais ainsi menés indiquent que les effets de l'HE de pin d'Alep dépendent de la sensibilité de la bactérie et à l'origine botanique de l'HE utilisée.

Quant à l'HE de géranium son effet est plutôt dose dépendant. En effet plus le volume d'HE utilisé est important plus l'effet engendré sur la croissance bactérienne est visible.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Sadou *et al.*, (2015) qui ont observé une sensibilité plus importante chez *Staphylococcus aureus* que (Gram+) chez *E. coli* (gram-) vis-à-vis de HE de Pin d'Alep.

D'autres études réalisées notamment celle réalisé par Xianfei (2007), ont montré que L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. speciosa* montre approximativement les mêmes résultats contre la souche *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de 23 mm.

Dans le même ordre d'idée Atailia et Djahoudi (2015) ont montré que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont plus résistantes à l'HE de *Géranium rosat* contrairement à nos résultats qui ont révélé que *Escherichia coli* (bactérie Gram négative) est plus sensible à l'action de l'huile essentielle de *géranium roseum* que *Staphylococcus aureus* (bactérie Gram positif). (Tableau 3)

Selon Chang *et al.* (2001), l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de plusieurs facteurs, notamment la nature des composés majoritaires, leur concentration, la nature et la structure des groupes fonctionnels, ainsi que les interactions potentielles entre les différents constituants.

D'après Oussalah *et al.* (2007), on peut généralement diviser les effets des huiles essentielles sur les bactéries en trois phases distinctes : d'abord, l'huile essentielle attaque la paroi bactérienne, ce qui augmente la perméabilité cellulaire et entraîne la perte des constituants cellulaires. Ensuite, elle provoque l'acidification de l'intérieur de la cellule, ce qui bloque la production d'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure. Enfin, elle détruit le matériel génétique, ce qui conduit à la mort de la bactérie.

Lorsqu'on examine les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de géranium rosat (7,5 et 3,75 μ l) et de pin d'Alep (15 μ l), on constate une réduction de la viabilité cellulaire, avec un effet létal observé au bout de 18 heures.

Il est important de noter que les composés majoritaires des huiles essentielles sont souvent responsables de leur activité antibactérienne, comme l'ont souligné Kalemba et Kunnucka (2003). Par exemple, l'huile essentielle de *Pelargonium roseum* est riche en composés contenant des groupes acétates, ce qui contribue à renforcer l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyl, en particulier, se révèle plus efficace que le géraniol lui-même, et il possède des propriétés antibactériennes contre un large éventail de bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Dans le cas de *Pinus halepensis* a montré un effet inhibiteur contre *S. aureus* la CMI de cette dernière a été déterminé à 15 μ l, par contre *E. coli* a été la souche la moins sensible, celle-ci n'a pu être inhibée. (Tableau 3).

La résistance élevée de *E. coli* est attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipo-polysaccharidique. L'absence de cette barrière, chez *S. aureus* permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant, une

augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des Constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique (Sadou *et al.*, 2015)

Selon Chang *et al.*, (2001), le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir la nature des composés majoritaires et la Concentration de ces composés, nature et structure des groupements fonctionnels et l'interaction probable entre les différents constituants.

En général, ces huiles agissent en ciblant principalement la membrane plasmique des bactéries, en raison de la nature hydrophobe des composés qu'elles contiennent. Cette caractéristique favorise leur intégration entre les phospholipides de la membrane et leur solubilisation dans la bicouche lipidique, ce qui perturbe la structure de la membrane plasmique et altère sa perméabilité aux ions et autres constituants cellulaires (Carson *et al.*, 2006).

En considérant la diversité moléculaire des huiles essentielles, il semble que leur activité antibactérienne résulte de l'action combinée de plusieurs mécanismes agissant à la fois sur les membranes plasmiques et les parois bactériennes. Les huiles essentielles agissent en entravant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Leur efficacité antimicrobienne dépend principalement de leur composition chimique, en particulier des composés volatils majeurs (Oussalah *et al.*, 2007). Les aldéhydes et les terpènes, connus pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques, s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (Benayad, 2008). Cette caractéristique permet d'utiliser les huiles essentielles en phytothérapie en raison de leurs propriétés antiseptiques dans le traitement des maladies infectieuses.

Conclusion générale

L'extraction des huiles essentielles de *Pelargonium roseum* et *Pinus halpensis* par entraînement à la vapeur d'eau a montré un rendement de 0.6% et 0.5% respectivement avec des taux d'humidité de 8,16% et 3,29%.

Les résultats de notre étude suggèrent que les huiles essentielles de *Pélargonium roseum* et *Pinus halpensis* ont un potentiel antimicrobien contre les bactéries *Staphylococcus aureus* et *E. coli*, et que les huiles essentielles agissent d'une manière différente chez les souches testées. Dont l'huile essentielle de *Pinus halpensis* à une action inhibitrice sur la croissance de *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 30mm et *E. coli*, avec une zone de 20mm. Tandis que les huiles essentielles de *pélargonium roseum* ont été efficaces sur *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 24mm et *E. coli*, avec une zone de 22mm.

L'expérience menée indique clairement que l'effet dose dépendant et qu'elle dépend également de la bactérie utilisée.

A propos de la concentration minimale inhibitrice *E. coli* a été plus sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de *pélargonium roseum* avec une CMI de 3.75 µl, suivi par *Staphylococcus aureus* dont la croissance a été inhibée à 7.5 µl. la CMI de la croissance de *Staphylococcus aureus* par l'HE de *Pinus halpensis* est de 15 µl alors qu'il n'a eu aucun effet sur *E. coli*.

Selon les résultats que nous avons obtenus, il serait intéressant de développer l'étude de ses huiles essentielles pour déterminer les mécanismes exacts de leur activité antimicrobienne, l'influence d'autres méthodes d'extraction sur le rendement, étendre cette étude a bon nombre d'huiles essentielles, Identifier les molécules bioactives spécifiques pour chaque activité biologique.

Références bibliographique

1. **Abdoul. D., (2002).** Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Université Ouagadougou.
2. **Andreani. S., (2014).** Valorisation d'espèces envahissantes des genres Xanthium et Senecio: Caractérisation, variabilité chimique et activités des huiles essentielles .Université Pascal Paoli.
3. **Atailia I., Djahoudi A.,(2015)** Chemical composition and antibacterial activity of geranium essential oil (Pelargonium graveolens L'Hér.) cultivated in Algeria. *Phytothérapie*, 13:156-157.
4. **Bakkali, F., Aerbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M., (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2),446-475.
5. **Baudoux D., (1997)** - Un procédé, une analyse, une définition. *Aroma News. Lettre d'information de N.A.R.D: Natural Aromatherapy Research and Development.*
6. **Belaiche . P., (1979)** - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme. Éd. Maloine. Paris.
7. **Benayad .N.. (2008).**Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales Marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, Mémoire, Université Kasdi Merbah, Ouargla,
8. **Benhabiles . N.E., (1995).**Comparaison des huiles essentielles de deux espèces algériennes de romarin : extraction et étude analytique. thèse magister, ENP alger.
9. **Bhavaniramy S., Vishnupriya, S., Al-Aboody MS., Vijayakumar R., Baskaran D., (2019).** Role of essential oils in foodsafety: Antimicrobial and antioxidant applications *Grain&Oil Science and Technology*, Volume 2 , pp. 49-55
10. **Bottone, E.J.,(2010).**Bacillus cereus, a volatile human pathogen. *clinical microbiologie reviews*, 23(2), 382-398.
11. **Bouguenna. S., (2011).**Diagnostic écologique, mise en valeur et conservation des pineraies de (*Pinus halepensis* Miller) de la région de Djerma (Nord-est du parc national de Belezma, Batna).Thèse magister .P 31.
12. **Boukhatem, M.N., Hamaidi, M. S., Saidi, F (1), Hakim, Y., Benomier, K.,(2010).**Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermopharmacie. *Nature et Technologie*° 02, pp.50-55.

13. **Boukhatem, M.N., Saidi, F., Hamaidi, M.S., Hakim, Y., Mekarnia, M.,(2011).**Culture et exploitation industrielle du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) en Algérie : état des lieux et perspectives. *Phytothérapie*9: 304–305.
14. **Bousbia .N.,(2011)** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires. [Thèse]. Alger. Ecole nationale supérieure agronomique.
15. **Boutchiche. F et Boutrigu. S .,(2016).** Caractérisation morpho métrique de la chenille processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa*) et de son hôte au niveau de la wilaya de Tlemcen. Mém, master en génétique, univ. Tlemcen, 79 p.
16. **Bruneton J., (1993).**Pharmacognosie: phytochimie , plantes médicinales. Paris:Tec. et Doc.Lavoisier, 1993, p.623.
17. **Bruneton J., (1999).**pharmacognosie-phytochimie-plantes médicinales.3eme édition technique &documentation.lavoisier, Paris.
18. **Buronzo, A.M., (2008)-.** Grand guide des huiles essentielles : Santé, Beauté, Bien- Etre, HACHETTE pratique, p.14.
19. **Carson C-F .,Hammer K A.,Riley T V., (2006)** *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties.
20. **Carson .C.F., Mee B.J. & Riley T.V., (1995).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1914-1920
21. **Chang S.T., P.F. Chen & S.C. Chang ., (2001).** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.*, 77 (1), 123-127.
22. **Ciccarelli .D., Garbari F. and Pagni A. M., (2008).** The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae) : secretory structures, unicellulairpapillae, and their ecological role. *Flora* 203,85-93.
23. **Couic-Marinier et Lobsteine., (2013)**Composition chimique des huiles essentielles
24. **Cronquist, A. 1981** an integrated system of classification of flowering plants. Columbia university press, new york ,248– 250.
25. **Cruz Cabral et al., (2013)** .*International Journal of Food Microbiology* 166 1–14
26. **Damyeh .S .M. , Niakousari M., Saharkhiz M J., (2016).**
27. **De Feo V., De Simone F. and Snatore F., (2002).** Potential allelochemicals from the essential oils of *Rutgraveolens*. *phytochemistry* 61,573-578.

28. **Demarne, F.(1992)**. Histoire de la culture botanique et systématique du géranium. In : Le géranium rosat à la Réunion. APR, CIRAD, Chambre d'agriculture de la Réunion, CAHEB, Réunion-SPV, SAFER-Réunion. Ed. Saint-Denis : 23-25.
29. **DEYSON .G., (1954)**. Eléments d'anatomie des plantes vasculaire ED. SEDES. Pp :5–13.
30. **Djibo. A.K., Samaté A.D. et Nacro M., (2004)** - Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Linn., syn. *O. canum* Sims du Burkina Faso. Comptes Rendus Chimie, 7 : 1033-1037.
31. **Dob. T., Berramdane T., et Chelgoum C ,(2005)**. Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria, Comptes Rendus Chimie, 8 (11–12) November–December., p (1940-1945).
32. **Duval .L.,(2012)** Les huiles essentielles à l'officine. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Pharmacie. Université de Rouen..
33. **Falleh. H., Ben Jemaa M., Saada M., Ksourir .,(2020)**.
34. **Farhat, A., (2010)**. Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application. Thèse de Doctorat en Sciences (option : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
35. **Fekih N.,(2015)**. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie [thèse]. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid.
36. **Figueredo Gilles .,(2007)** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne.
37. **Fißler.M., Quante A.,(2014)** Food Chemistry, 330 , Article 127268.
38. **Fouche G., Horak, M. R., Wadiwala, E ., Maharaj, V.G., (2002)**. Investigation of the commercial potential of *Lippia javanica*. Poster presented at the 36th Convention of the South African Chemical Institute, 1-5 July, Port Elizabeth.
39. **Gabriel I., Alleman F., Dufourcq V., Perrin F. & Gabarrou J.F., (2013)**. INRA Productions Animales, 26 (1), 13-24.
40. **Garneau F.X.,(2004)** - Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 1-16.

41. **Ghestem A., Seguin E., Paris M. et Orecchioni A.M. (2001)** - Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, - Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
42. **Guignard J.L., (1983)**, Abrégé de botanique, Masson, 5^{ème} édition, Paris, 259 p
43. **Guignard J-L., (2000)** biochimie végétale paris (2^{ème}ed) pp.274
44. **Hayes A.J. and Markovic. B .,(2002)**. Toxicity of Australian essential oil Backhousiacitriodora (lemon myrtle). Part 1.Antimicrobialactivity and in vitro cytotoxicity, Food and chemical toxicology, 40, 535 –543.
45. **Isman. M. B., (2000)**. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot.19, 603- 608.
46. **Juliani. H.R., Karoch, A.R., Juliani, H.R., Trippi, V. S., Zygadlo, J. A., (2002)**. Intraspecific variation in the leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) Tronc. Biochemical Systematics and Ecology, 30,163-170.
47. **Kadik B., (1987)**. Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) En Algérie: Ecologie, dendrométrie, morphologie. Ed. OPU. Alger., 581p.
48. **Kadik B., (1983)** : Etude du Pin d'Alep en Algérie. Thèse de doctorat d'Etat. Université d'Aix-Marseille 3. Marseille. 313 p.
49. **Kaibeck J., (2013)**, les huiles végétales, c'est malin Leduc.s , pages 30-31
50. **Kalembe d., et Kunucka A.,(2003)**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. CURRENT medicinal chemistry 10(10), 813-829.
51. **Kaloustain J., Hadji Minaglon F., Vanelle F., (2013)**. la connaissance de huile essentielle : qualilogie et aromathérapie : entre science et traduction pour une application médicale raisonnée. ED. Springer verlag France.226.
52. **Kapetanovic.,(1984)** in DUVAL Laurent Les Huiles Essentielles à l'officine 2012
53. **Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F ., (2005)** Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods ., Food chemistry, - Elsevier
54. **Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Bradshaw, S.; Louw, W.; Chemat, F.,(2007)**. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. J. Food Engineer. 79,1079-1086.
55. **Masyita,A.,Sari RM.,stuti AD., Yasir B., RumataNR., EmranTB., Nainu F., Simal-Gandara FJ.,(2022)**. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential

- oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. Elsevier. Food Chemistry Volume 13, pp. 1-14
56. **Miller, M., (2002).** Geranium and Pelargonium. The taxonomy of Geranium species and cultivars, their origins and growth in the wild (Ed) Taylor & Francis. South Bank University, London, UK, 49-79.
 57. **Naves. Y.R., (1976) :** Parfums, Cosmétiques, savons, Vol. 58, p. 105. Cité in GARNERO J., 1996 : Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 pp 1-45.
 58. **Ojeniyi .B., (1994)** Polyagglutinable Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. A survey. APMIS Suppl;46:1-44.
 59. **Ouaar. Dj., BENALI, A. , LOTTE , S., GERARD, J . , TOUMI – BENALI,**
 60. **Ouissam. N., (2014).** Composition chimique et effet antimicrobien de huile essentielle de Pelargonium graveolens (Géranium rosat) , mémoire de Master Sciences et Techniques, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah , Maroc.
 61. **Oussalah. M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: E. coli O157:H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control. 18 (5), 414-420.
 62. **PELLERIN P., (1991),** Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry, Perfum. Flavor., 16, 4, pp. 37-39.
 63. **Pibiri. P., (2006).** Assainissement microbiologie de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit. EPFL (Suisse).
 64. **Quézel .P. & Santa S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris. Volume, 1170p.
 65. **Quézel. P. et Médail F., (2003) :** Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. 571p. 6p.
 66. **Racha. M., Faïle C., Kallassy M., Gohar M., (2016).** Bacillus cereus Biofilms same, only different. Frontiers in microbiology.
 67. **Rameau, J.C., Mansion, D., et Dumé, G., (2008).** Flore forestière française: région méditerranéenne (Vol.3). Forêt privée française. 2432P.
 68. **Robin . D ., (2017).** Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie.
 69. **Rojas. A, Buitrago A ., (2015).** Book Therapeutic Medicinal Plants. 1st edition

70. **Socasau .C, (2015)** .Les huiles essentielles référencées à l'Agence Européenne du Médicament.
71. **Sabrina. Krief., (2003)** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda activités biologiques et étude chimique de plantes consommées.
72. **Sadou. N., Seridi R., Djahoudi A., HadeF Y., (2015)**. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles des aiguilles *Pinushalepensis* Mill de nord West algérien. *Rev.Sci. Technol.Synthèse* 30 :33-39.
73. **Said. O, HassaneS, BadrSatrani, Ghanmi M, Mansouri N, Hayria Mo, Chaouch A,(2011)**. Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle de *Plectranthusaromaticus* Roxb. De l'Ile de la Grande Comore, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2), 251-258.
74. **Smallfield .B., (2001)** – Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop& Food Research.* Number 45, p4.
75. **Stephane. F Y., Jules B K J., (2020)**. Extraction of bioactive compounds from medicinal plants and herbs .
76. **Stevanovic Z D, SieniawskaE., Glowniakk., Obradovic N., Pajic-Lijakovic I.,(2020)**Natural Macromolecules as Carriers for Essential Oils: From Extraction to Biomedical Application *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, p. 8
77. **Taleb toudert., (2015)**. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatique provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *Callosobuchusmaculatus* (Coleoptera : bruchidae). Thésedoctorat.univesité Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.
78. **TUCAROV J., (1964)**, Influence des facteurs exogènes sur le rendements et la qualité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L., *La France et ses parfums*, 7, 40, pp. 277-283.
79. **Venet. J. (1986)**. Identification des outils et méthodes utilisées à Dynafor concernant la Dendrochronologie. Boudy P. 1955. *Economie forestière nord-africaine.* Tome 4 : Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie. Larose, Paris ,483 p.
80. **Ventola CL., (2015)**.The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* 40: 277–283. [PMCID: PMC4378521.
81. **Viljoen .A.M., Denirci B., Baser K.H.C., Potgieter C.J. and Edwards T.J. (2006)** - Micro distillation and essential oilchemistry- a usefultool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 72:99-104.

82. **Virginie. L .,** (2015) Huiles essentielles et 1,8-cineole
83. **Wootton beard, P.C., Ryan L..** (2011). Improving public health: the role of antioxidant rich fruit and vegetable beverages. Food research international, 44(10), 3135–3148
84. **Xiao Y., Zhao R., Liu Z Z., Zhang L., Gu H Y., Yang F J., Yang L., Liu T T.** 2023
85. **Zahalika, & Jean philippe.** (2010). Les huiles essentielles. Dauphin .paris. p3049
86. **Zarai .Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub A. et Gharsallah N.,** (2011).The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of Marrubium vulgare L. essential oil grown in Tunisia, Lipids in Health and Disease, Vol.10, 161.
87. **Zenzen .W.,**(2016). Utilisation du S. IG pour l'analyse de la structure de la forêt de Ouennougha dans la Wilaya de Bordj Bou Arreridj, mémoire, master en foresterie univ Tlemcen, 60p.
88. **Zouari-Ben Bechir, W., Bouzouatia, N., Kachouri, F. ,**(2017).chemical composition, antibactériel and antioxidant activities of essentail oils form Pinushalepensis Mill. growing in Tunisia. Journal of Oleo Science, 66(1), 86-97.

Annexes

Composition du milieu Muller Hinton

Le milieu Mueller-Hinton avec ou sans addition de sang de mouton est préparé selon la formule décrite par OMS.

Infusion de viande 2,0

Hydrolysate de caséine 17,5

Amidon de maïs 1,5 pH

final $7,3 \pm 0,1$

Ca²⁺ 20 - 25 mg/L

Mg²⁺ 10 - 12,5 mg/L

* formule adaptée pour assurer les meilleures performances du milieu. Préparation du milieu : Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon. Mélanger 25 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Répartir en tubes ou flacons stériles.

Analyse d'anova

Huile 1 : pin

Anova

```
> anova(an)
```

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: Effet
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Bacterie	1	2.778	2.7778	13.5501	0.001709	**
Substance	2	35.882	17.9411	87.5176	5.33e-10	***
Dose	2	0.174	0.0869	0.4241	0.660717	
Bacterie:Substance	2	2.696	1.3478	6.5745	0.007185	**
Bacterie:Dose	2	0.271	0.1353	0.6599	0.528972	
Substance:Dose	4	0.229	0.0574	0.2798	0.887189	
Bacterie:Substance:Dose	4	0.526	0.1315	0.6416	0.639726	
Residuals	18	3.690	0.2050			

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Groupe Homogènes
```

```
> SNK.test(an,"Bacterie",console=TRUE,main="")
```

```
Study:
```

```
Student Newman Keuls Test  
for Effet
```

```
Mean Square Error:  0.205
```

```
Bacterie, means
```

	Effet	std	r	Min	Max
E_coli	1.083333	0.8473141	18	0	2.0
Staphylococcus	1.638889	1.3560925	18	0	3.7

```
Alpha: 0.05 ; DF Error: 18
```

```
Critical Range
```

```
2  
0.3170776
```

```
Means with the same letter are not significantly different.
```

	Effet	groups
Staphylococcus	1.638889	a
E_coli	1.083333	b

```
> SNK.test(an,"Substance",console=TRUE,main="")
```

Study:

Student Newman Keuls Test
for Effet

Mean Square Error: 0.205

Substance, means

	Effet	std	r	Min	Max
AB	2.366667	0.7969639	12	1.2	3.7
ED	0.000000	0.0000000	12	0.0	0.0
HE	1.716667	0.5540485	12	1.0	3.0

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Range

2	3
0.3883392	0.4717476

Means with the same letter are not significantly different.

	Effet	groups
AB	2.366667	a
HE	1.716667	b
ED	0.000000	c

```
> SNK.test(an, "Dose", console=TRUE, main="")
```

Study:

Student Newman Keuls Test
for Effet

Mean Square Error: 0.205

Dose, means

	Effet	std	r	Min	Max
D1	1.300000	1.163849	12	0	3.0
D2	1.458333	1.218388	12	0	3.5
D3	1.325000	1.161602	12	0	3.7

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Range

	2	3
	0.3883392	0.4717476

Means with the same letter are not significantly different.

	Effet	groups
D2	1.458333	a
D3	1.325000	a
D1	1.300000	a

```
> |
```

Huile 2 : Geranium

Anova

```
> anova(an)
```

Analysis of Variance Table

Response: Effet

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Bacterie	1	0.1111	0.1111	1.5038	0.23589
Substance	2	11.5617	5.7808	78.2368	1.324e-09 ***
Dose	2	12.1867	6.0933	82.4662	8.646e-10 ***
Bacterie:Substance	2	0.4306	0.2153	2.9135	0.08013 .
Bacterie:Dose	2	0.1156	0.0578	0.7820	0.47245
Substance:Dose	4	6.5367	1.6342	22.1165	9.569e-07 ***
Bacterie:Substance:Dose	4	0.2678	0.0669	0.9060	0.48129
Residuals	18	1.3300	0.0739		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Groupe homogene

```
> SNK.test(an,"Bacterie",console=TRUE,main="")
```

Study:

Student Newman Keuls Test
for Effet

Mean Square Error: 0.07388889

Bacterie, means

	Effet	std	r	Min	Max
E_coli	0.7444444	0.8965438	18	0	2.2
Staphylococcus	0.8555556	1.0506145	18	0	2.8

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Range

2
0.1903611

Means with the same letter are not significantly different.

	Effet groups
Staphylococcus	0.8555556 a
E_coli	0.7444444 a

```
> SNK.test(an,"Substance",console=TRUE,main="")
```

Study:

Student Newman Keuls Test
for Effet

Mean Square Error: 0.07388889

Substance, means

	Effet	std	r	Min	Max
AB	1.241667	0.9903703	12	0	2.8
ED	0.000000	0.0000000	12	0	0.0
HE	1.158333	0.9624385	12	0	2.4

Alpha: 0.05 ; DF Error: 18

Critical Range

2 3
0.2331438 0.2832190

Means with the same letter are not significantly different.

	Effet groups
AB	1.241667 a
HE	1.158333 a
ED	0.000000 b

Résumé

Les huiles essentielles de Pelargonium roseum et Pinus halpensis ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau. Les rendements d'extraction obtenus des feuilles fraîches de géranium et des feuilles fraîches de pin d'Alep sont respectivement 0.6% et 0.5%.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a montré que l'huile essentielle de pin d'Alep à une action inhibitrice sur la croissance Staphylococcus aureus et Escherichia coli avec des zones d'inhibition qui varient entre 1 et 3 cm avec une CMI de 15 µl. Tandis que l'huile essentielles de géranium à été efficaces sur Staphylococcus aureus et Escherichia coli avec des zones d'inhibition qui varient entre 1 et 2.4 cm et de CMI 7,5 et 3.75 µl. Ces résultats Démontre que les huiles essentielles peuvent être utilisées comme alternative naturelle aux antibiotiques pour traiter les infections bactériennes.

Mots clés : *Huiles essentielles, Escherichia coli, Plargonium roseum, Pinus halpensis, Staphylococcus aureus, activité antibactérienne.*

Abstract

Pelargonium roseum and Pinus halpensis essential oils were extracted by steam stripping. The extraction yields obtained from fresh geranium leaves and fresh Aleppo pine leaves were 0.6% and 0.5% respectively.

Evaluation of antimicrobial activity showed that Aleppo pine essential oil had an inhibitory action on the growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli, with inhibition zones varying between 1 and 3 cm at a MIC of 15 µl. While geranium essential oils were effective against Staphylococcus aureus and Escherichia coli with inhibition zones ranging from 1 to 2.4 cm and MICs of 7.5 and 3,75 µl. These results demonstrate that essential oils can be used as a natural alternative to antibiotics to treat bacterial infections.

Key Words : *Essential oil, Escherichia coli, Plargonium roseum, Pinus halpensis, Staphylococcus aureus, antimicrobial activity.*