



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



Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Thèse

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences

Filière: Biologie

Option : Microbiologie

Présentée par: M. BOUYAHYAOUI Ahmed

Thème

Contribution à la valorisation des substances naturelles :
Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région de
l'Atlas algérien

Devant le jury

CHERIGUENE Abderrahim	Professeur	U. Mostaganem	Président
BEKADA Ahmed	Professeur	U. Tissemsilt	Examineur
BENHASSEINI Hachemi	Professeur	U. Sidi Bel Abbas	Examineur
MEKHALDI Abdelkadeur	Professeur	U. Mostaganem	Examineur
BAHRI Fouad	Professeur	U. Mostaganem	Encadreur
ROMANE Abderrahmane	Professeur	U. Cadi Ayyad Marrakech Maroc	Co-encadreur

Année universitaire : 2016 - 2017

Remerciements

Je tiens à remercier M. CHERIGUENE A, Professeur à l'université Ibn Badis Mostaganem d'avoir accepter de présider mon jury.

Mes remerciements les plus vifs à mon promoteur M. BAHRI. F Professeur à l'université Ibn Badis Mostaganem et à mon co-promoteur M. ROMANE. A Professeur à l'université Cadi Ayyad Marrakech (Maroc) pour leur collaboration menée avec patience et persévérance.

Je remercie également MM. BEKADA A, Professeur à l'université de Tissemsilt, BENHASSEINI H, Professeur à l'université de Sidi Bel Abbès et MEKHALDI A, Professeur à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail.

A toute personne ayant collaboré à la réalisation de ce travail.

Enfin à tous mes collègues et mes amis pour leur soutien moral.



..... MERCI

المخلص

Abstract

Résumé

الملخص

ان استخلاص الزيوت الطيارة بطريقة التقطير المائي من أوراق و ثمار العرعر الفينيقي *Juniperus phænicea* L. و أوراق العرعر الشريبي *Juniperus oxycedrus* L. المتواجد بـجبال الاطلس الصحراوي، اعطت معدلات المردود التالية (الأوراق 0,6 – 0,9 %، الثمار: 2 – 2,5 % و الأوراق: 0,1 %) على الترتيب. كما مكنت التحاليل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة CG-SM من التعرف على معظم المركبات العضوية المتطايرة لهذه الزيوت. إلا ان التربينات الاحادية الاساسية تمثلت في الفا- بينان، بالإضافة الى كميات قليلة من السيسكويتربينات مثل دلتا- جيرماكران و بيتا- كريفيلان. ان زيوت اوراق *J. phænicea* بدت جد فعالة من زيوت الثمار و زيوت اوراق *J. oxycedrus* ؛ حيث تراوحت التراكيز المثبطة الدنيا MIC بين 13.8 و 1380 مكغ/مل و هذا ضد معظم السلالات المختبرة و المسؤولة عن عدوى المستشفيات (*Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa*) و *J. phænicea* و *J. oxycedrus* نفس النشاط ضد الأكسدة حيث قدرت قيمة معدل التركيز الفعال المانع للأكسدة بنسبة 50 % (EC50) بـ: 0,74 ± 22,51 مكغ/مل، بينما قدر بـ: 2,47 ± 35,57 مكغ/مل لفيتامين ج و بـ: 3,24 ± 65,30 مكغ/مل لزيوت ثمار *J. phænicea*.

الكلمات المفتاحية: العرعر الفينيقي، العرعر الشريبي، الاطلس الصحراوي، الزيوت الطيارة، النشاط ضد الميكروبي، النشاط ضد الاكسدة.

Abstract

The extraction of essential oils from the fruits of the *Juniperus phænicea* L. as well as from the dry leaves of *Juniperus oxycedrus* L., available in the Saharan Atlas, yield the following rates (leaves: 0,6 – 0,9 %, berries: 2 – 2,5 % and leaves: 0,1 %) respectively. Then again, the analysis of these oils by GC-FID and GC-MS enabled the identification of the major volatile organic compounds existing in these leaves and fruits. However, the major monoterpene in these oils was the α -pinene accompanied by lesser amounts of the sesquiterpenes as β -caryophyllene and germacrene D. The *J. phænicea* leaf oils have proved more effective vis-a-vis the berries and leaves of *J. oxycedrus*. The results showed a significant antimicrobial effect against the majority of the tested strains responsible for nosocomial infections (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) with MIC (minimum inhibitory concentrations) ranging from 13,8 to 1380 μ g/ml. Moreover, the antioxidant activity of all essential oils' leaves of *J. phænicea* and of *J. oxycedrus* have shown an identical reaction, estimated to 50 % EC50 (effective concentration) of 22,51 ± 0,74 μ g/ml; while the EC50 of vitamin C was assessed to (35,57 ± 2,47 μ g/ml) and that of essential oils of berries of *J. phænicea* was evaluated at 65,30 ± 3,24 μ g/ml.

Keywords: *Juniperus phoenicea*, *Juniperus oxycedrus*, Saharan Atlas, essential oils, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Résumé

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation à partir des feuilles et baies sèches de *Juniperus phœnicea* L., ainsi que celles des feuilles sèches de *Juniperus oxycedrus* L. se trouvant dans les monts de l'atlas saharien, ont donné des rendements moyens de (feuilles: 0,6 – 0,9 %, baies: 2 – 2,5 % et feuilles: 0,1 %) respectivement. L'analyse de ces huiles par CG-SM a permis l'identification de la majorité des composés volatils de ces huiles essentielles. Cependant, le monoterpène majoritaire dans ces huiles a été l' α -pinène, accompagné par de faibles quantités de sesquiterpènes comme le β -caryophyllène et le germacrène D. En outre, les huiles essentielles des feuilles de *J. phœnicea* se sont montrées plus actives que celles des baies et des feuilles de *J. oxycedrus* avec des CMI (concentrations minimales inhibitrices) de 13,8 à 1380 $\mu\text{g/ml}$ contre la majorité des souches testées responsables des infections nosocomiales (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*). De plus, l'activité antioxydante de toutes les huiles essentielle des feuilles de *J. phœnicea* et *J. oxycedrus* ont montré le même effet à la CE50 (concentration efficace à 50) moyenne de $22,51 \pm 0,74 \mu\text{g/ml}$; tandis que la CE50 de la vitamine C a été estimée à $(35,57 \pm 2,47 \mu\text{g/ml})$, alors que celle des baies de *J. phœnicea* a été évaluée à $65,30 \pm 3,24 \mu\text{g/ml}$.

Mots-clés: *Juniperus phoenicea*, *Juniperus oxycedrus*, Atlas Saharien, huiles essentielles, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
01	Distribution des cupressacées dans le monde par hémisphère	04
02	Les essences forestières du bassin méditerranéen	07
03	Espèces arborées des montagnes d'Algérie	07
04	Les superficies en Ha par décennie des principales essences forestières en Algérie	08
05	Propriétés de quelques composés des huiles essentielles	23
06	Données climatiques des localités de l'enquête	42
07	Caractéristiques de la population d'enquête	45
08	Résultats de l'enquête ethnopharmacologique	46
09	Taux des cendres des feuilles et baies de <i>J. phænicea</i> et <i>J. oxycedrus</i>	52
10	Teneur en métaux des feuilles, baies et des rameaux de <i>J. phænicea</i> et <i>J. oxycedrus</i>	53
11	Résultats du criblage phytochimique	55
12	Rendements (%) en huiles essentielles des espèces étudiées	59
13	Composition chimique des huiles essentielles de <i>Juniperus phænicea</i> (site 1)	61
13	Composition chimique des huiles essentielles de <i>Juniperus phænicea</i> (site 1) suite	62
14	Composition chimique des huiles essentielles de <i>Juniperus phænicea</i> (site 2)	63
15	Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Juniperus oxycedrus</i>	64
16	Les antibiotiques testés	68
17	Phénotypes de résistance des souches microbiennes testées	71
18	Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/ml}$) des huiles essentielles de <i>J. phoenicea</i> et <i>J. oxycedrus</i>	74

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
01	Distribution de la section <i>Caryocedrus</i> et la section <i>Juniperus</i> (sect. <i>Oxycedrus</i>)	05
02	Distribution de <i>Juniperus</i> sect. <i>Sabina</i>	05
03	Carte des groupes de végétations	06
04	Classification détaillée de l'ordre des Cupressales	10
05 (a)	Arbre de <i>J. phoenicea</i>	12
05 (b)	Feuilles en écailles de <i>J. phoenicea</i> (loupe x20)	12
05 (c et d)	feuilles et baie de <i>J. phoenicea</i>	12
06 (a)	Arbre de <i>J. oxycedrus</i>	14
06 (b)	Feuilles de <i>J. oxycedrus</i> (loupe x 20)	14
06 (c)	Feuilles et baies de <i>J. oxycedrus</i>	14
07	Structure de quelques composés terpéniques	20
08	Structure de quelques dérivés des phénylpropanes	21
09	Techniques d'extraction des huiles essentielles et extraits	25
10	Montage d'extraction par entrainement à la vapeur	26
11	Montage d'hydrodistillation	27
12	Dispositif de l'extraction assistée par micro-ondes	28
13	Extraction par expression à froid	28
14	Technique d'enfleurage	29
15	Technique d'extraction par CO ₂ supercritique	31
16	Schéma de la CPG/FID	33
17	Schéma de la CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM)	34
18	Régions de l'enquête ethnopharmacologique	41
19	Carte géographique de la région d'étude	50
20	Montage de l'hydrodistillation	56
21	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de <i>J. phoenicea</i> et <i>J. oxycedrus</i>	73
22	Concentrations efficaces 50 de la vitamine C et des huiles essentielles des espèces étudiées.	76

Table des matières

Introduction générale	01
Partie I. Synthèse bibliographique	
Chapitre I. Etude bibliographique sur les cupressacées	
I. Introduction	03
II. Les cupressacées dans le monde	03
III. Les cupressacées en Algérie	06
IV. Les cupressacées dans l'atlas algérien	08
V. classification systématique des cupressacées	10
VI. Systématique et description botanique des espèces sélectionnées	11
VI.1. Systématique du genévrier de phénicie	11
VI.2. Description botanique du genévrier de phénicie	11
VI.3. Systématique du genévrier oxycèdre	13
VI.4. Description botanique du genévrier oxycèdre	13
VII. Utilisation des espèces étudiées en médecine traditionnelle	15
VIII. Rappel bibliographique sur les études de la composition chimique des Huiles essentielles des espèces étudiées	15
IX. Conclusion	17
Chapitre II. Rappel bibliographique sur les huiles essentielles	
I. Les huiles essentielles	18
I.1. Historique	18
I.2. Définition et rôle écologique des huiles essentielles	18
I.3. Composition chimique des huiles essentielles	19
1.3.1. Les terpènes	19
1.3.2. Les phénylpropanes	21
I.4. Contrôle de qualité	21
I.5. Caractéristiques économiques des huiles essentielles	22
I.6. Activité biologique des huiles essentielles	22
I.7. Phénomènes physico-chimiques et température	24
II. Les techniques d'extraction des huiles essentielles	24
II.1. Entraînement à la vapeur d'eau 'ex-situ' ou vapo-hydrodistillation	25
II.2. Entraînement à la vapeur d'eau 'in-situ' ou hydrodistillation	26
II.3. Extraction assistée par micro-ondes	27
II.4. Expression à froid	28
II.5. Enfleurage (extraction par la graisse froide)	29
II.6. Macération (extraction par la graisse chaude)	30
II.7. Extraction par des solvants	30
II.8. Extraction par les fluides supercritiques (CO ₂)	31
III. Techniques d'analyse des huiles essentielles	32
III.1. Analyse par les couplages conventionnels	32

III.1.1. Introduction	32
III.1.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG /FID)	32
III.1.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)	33
III.1.4. Le couplage CPG/SM/SM	35
III.1.5. Autres techniques d'analyse des huiles essentielles	35
III.2. Séparation des constituants préalablement à leur identification	36
III.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable	36
IV. Conclusion	39

Partie II. Partie expérimentale

Chapitre III. Etude ethnopharmacologique des espèces étudiées

I. Introduction	40
II. Moyens et méthodes	40
II.1. Description et choix des localités de l'enquête	40
II. 2. Déroulement de l'enquête	42
III. Résultats et discussion	45
IV. Conclusion	48

Chapitre IV. Caractérisation chimique des plantes étudiées

I. Introduction	50
II. Matériel végétal	50
III. Dosage des métaux lourds	51
III.1. Incinération	51
III.2. Préparation des différentes solutions par attaque acide	51
III.3. Dosage des solutions	51
III.4. Calcul de la teneur en métaux	52
III.5. Résultats et discussion	52
III.5.1. Teneur en cendres	52
III.5.2. Teneur en métaux	53
IV. Criblage phytochimique	53
IV.1. Matériel et méthodes	53
IV.1.1. Les flavonoïdes	54
IV.1.2. Les alcaloïdes	54
IV.1.3. Les tanins	54
IV.1.4. Les quinones	54
IV.1.5. Les terpènes et stérols	54
IV.1.6. Les saponines (saponosides)	55
IV.1.7. Les anthraquinones	55
IV.1.8. Les anthocyanes	55
IV.2. Résultats et discussion	55
V. Extraction et analyse des huiles essentielles	56
V.1. Matériel et méthodes	56
V.1.1. Détermination de la teneur en eau	56
V.1.2. Extraction des huiles essentielles	56

V.1.3. Calcul du rendement	57
V.1.4. Caractérisation physicochimique	57
V.1.5. Composition chimique	57
V.1.5.1. La chromatographie en phase gazeuse - détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF) couplée à la spectrométrie de masse (SM)	57
V.1.5.2. Identification des composés	58
V.2. Résultats et discussion	58
V.2.1. Teneur en eau	58
V.2.2. Rendement de l'hydrodistillation	59
V.2.3. Caractérisation physicochimique	59
V.2.3.1. Densité relative	59
V.2.3.2. Indice de réfraction	60
V.2.3.3. Pouvoir rotatoire	60
V.2.4. Composition chimique	60
VI. Conclusion	65

Chapitre V. Activités biologiques des huiles essentielles

I. Introduction	67
II. Matériel et méthodes	67
II.1. Activité antimicrobienne	67
II.1.1. Les souches microbiennes	67
II.1.1.1. L'antibiogramme	67
II.1.1.2. L'aromatogramme (méthode de Vincent)	69
II.1.1.3. La méthode de contact direct	69
II.2. Activité antioxydante	69
II.2.1. Principe	69
II.2.2. Protocole	70
III. Résultats et discussion	70
III.1. Résultats de l'antibiogramme	70
III.2. Résultats de l'aromatogramme	72
III.3. Résultats de la méthode de contact direct	73
III.4. Résultats de l'activité antioxydante	75
IV. Conclusion	77
Conclusion générale et perspectives	78
Bibliographie	80
Annexes	89

*Introduction
générale*

Introduction générale

Face aux problèmes de santé liés aux infections, maladies dégénératives, affections cutanées, cancer, diabète, intoxications alimentaires, etc., l'homme a toujours essayé de trouver des solutions parfois efficaces, mais qui ne sont pas sans danger sur son bien être. Dans la plupart du temps, la recherche a recours à la synthèse chimique des principes actifs (par exemple: antibiotiques, anticancéreux, anti-inflammatoires, additifs alimentaires, produits cosmétiques, pesticides, etc.). Hélas, l'émergence de microorganismes résistants voire même multirésistants, les effets néfastes des substances de synthèse (chimiothérapie, consommation des additifs alimentaires, présence d'antibiotiques et de pesticides dans la chaîne alimentaire, ...) a suscité l'intérêt des scientifiques de rechercher des substances naturelles bioactives. Ces dernières peuvent avoir plusieurs sources, mais le monde végétal reste un bon réservoir pour trouver des substituts aux substances de synthèse.

Effectivement, d'origine végétale, les huiles essentielles sont des substances naturelles qui possèdent un large spectre d'activité antibactérienne (Derwich et *al.*, 2010), antifongique (Dambolena et *al.*, 2010), antiparasitaire (Burt, 2004; Bakkali et *al.*, 2008), insecticide (Burt, 2004; Batish et *al.*, 2008; Kordali et *al.*, 2008). Cependant, il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie pharmaceutique, agronomique, alimentaire, sanitaire, industries cosmétiques et de parfums (Bakkali et *al.*, 2008).

En Algérie, les essences forestières naturelles sont localisées dans les régions septentrionales et se raréfient au fur et à mesure qu'on se déplace vers les zones désertiques. Parmi le cortège floristique dont dispose ce pays, on trouve les cupressacées (thuya, cyprès, genévrier) qui constituent aujourd'hui des essences forestières dites de protection et d'ornement. Néanmoins, il est certain que le recours au genévrier en médecine populaire se pratique depuis fort longtemps et l'usage de cette plante connaît un nouvel essor avec l'aromathérapie (Chevallier, 1997).

L'objectif de ce présent travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation des substances naturelles à travers l'étude des huiles essentielles des cupressacées de l'atlas saharien. En effet, nous avons choisi d'étudier les huiles essentielles de genévrier du sud ouest algérien, et plus spécialement les espèces *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* de la région d'Ain sefra, dans la wilaya de Naama.

Pour ce faire, nous avons envisagé d'organiser ce travail en deux parties. La première partie, composée de deux chapitres, se veut une synthèse bibliographique sur les cupressacées

puis les huiles essentielles; tandis que la deuxième est une partie expérimentale qui regroupe trois chapitres traitant successivement la caractérisation chimique, l'étude ethnopharmacologique et les activités biologiques des huiles essentielles des espèces étudiées. Dans chaque chapitre, nous présentons les résultats obtenus ainsi que leur discussion et enfin, nous concluons sur les résultats obtenus.

PARTIE I

*PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE*

I. INTRODUCTION

Les conifères appartiennent au groupe des gymnospermes, c'est-à-dire des plantes produisant des graines nues non enfermées dans un fruit. Ce sont aussi des végétaux vasculaires à graines en cônes, d'où leur nom. Tous sont des plantes ligneuses se présentant surtout sous la forme d'arbres, quelques-unes d'entre elles étant des arbustes (Caron, 2013).

L'ordre des coniférales est le plus important des gymnospermes. Il comprend sept familles (Araucariacées, Pinacées, Taxodiacees, Podocarpacees, Cupressacées, Cephalotaxacées, Taxacées), une centaine de genres et un millier d'espèces qui occupent une place considérable dans la biosphère. La moitié des forêts du globe sont, en effet, constituées totalement ou essentiellement de conifères (Collignon-Trontin, 2000).

Dans ce présent travail nous nous intéressons aux cupressacées. Ces dernières remplissent plusieurs rôles dans la nature, entre autres : écologiques (essence de protection et ornementale), économiques (production de bois, résines et huiles essentielles), etc.

II. LES CUPRESSACEES DANS LE MONDE

Les cupressacées représentent la famille (Cupressaceae) la plus cosmopolite avec dix genres dans chaque hémisphère, mais la plupart des espèces se trouvent dans l'hémisphère nord (tableau 01) (Enright et *al.*, 1996). Par ailleurs, la distribution de cette famille est sous l'influence de facteurs divers : climat, sol, perturbations (catastrophes naturelles, exploitation humaine), etc. (Banks, 2004).

Chapitre I _____ **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES CUPRESSACEES**

Tab. 01 – Distribution des cupressacées dans le monde par hémisphère (Enright et *al.*, 1996).

Taxon	Monde	Hémisphère		
		Nord	Les deux hémisphères	Sud
Genres	19	9	1	11
<i>Actinostrobus</i>	3	0		3
<i>Austrocedrus</i>	1	0		1
<i>Callitris</i>	16	0		16
<i>Calocedrus</i>	3	3		0
<i>Chamaecyparis</i>	7	7		0
<i>Cupressus</i>	13	13		0
<i>Diselma</i>	1	0		1
<i>Fitzroya</i>	1	0		1
<i>Fokenia</i>	1	1		0
<i>Juniperus</i>	50	50	1	1
<i>Libocedrus</i>	5	0		5
<i>Neocallitropsis</i>	1	0		1
<i>Papuacedrus</i>	3	0		3
<i>Pilgerodendron</i>	1	0		1
<i>Platycladus</i>	1	1		0
<i>Tetraclinis</i>	1	1		0
<i>Thuja</i>	5	5		0
<i>Thujopsis</i>	1	1		0
<i>Widdringtonia</i>	3	0		3
Total spp	117	82	1	36

Chapitre I _____ ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES CUPRESSACEES

Le genévrier ou *Juniperus* est un genre appartenant à la famille des cupressacées. Il est divisé en trois sections: *Caryocedrus* (1 espèce); *Juniperus* (*Oxycedrus*) (11 espèces) et *Sabina* (55 espèces) (figures 01 et 02) (Adams, 2004).

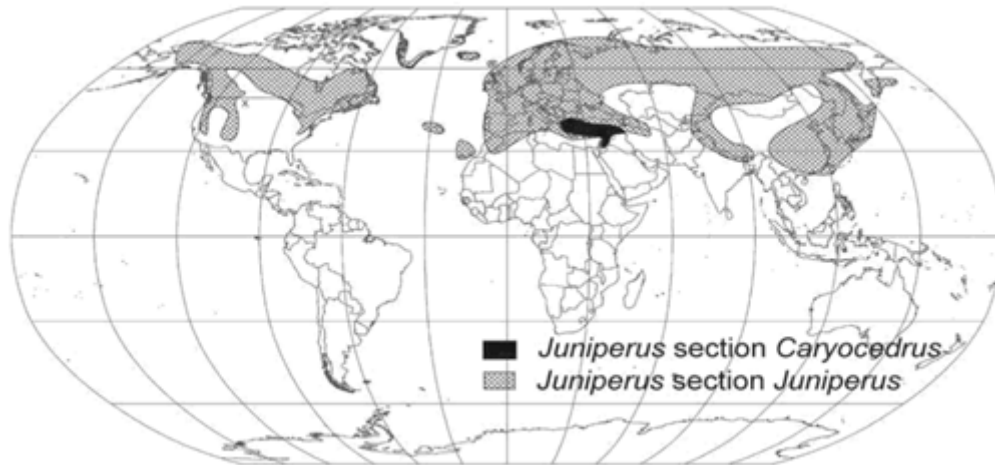


Fig. 01 - Distribution de la section *Caryocedrus* et la section *Juniperus* (sect. *Oxycedrus*) (Adams, 2004).

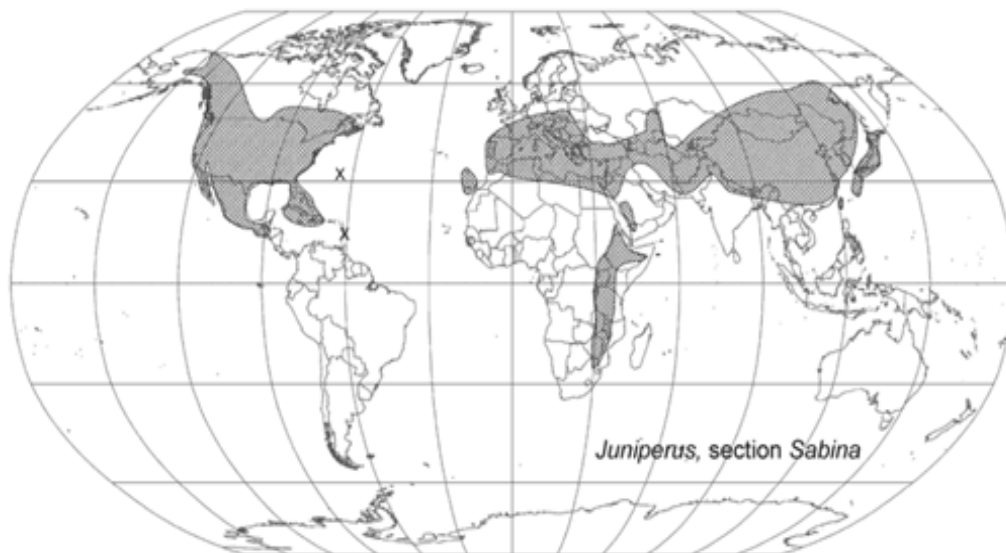


Fig. 02 - Distribution de *Juniperus* sect. *Sabina* (Adams, 2004).

III. LES CUPRESSACEES EN ALGERIE

L'Algérie a une superficie de 238174100 hectares. Du nord au sud, elle est divisée en trois régions géographiques bien distinctes :

- La région tellienne au nord de l'atlas tellien avec une superficie de 7,6% ;
- La région des hautes plaines comprise entre les deux atlas d'une superficie de 8,4%.
- La région désertique ou Sahara au sud de l'atlas saharien avec une superficie de 84% ;

Par ailleurs, les peuplements floristiques de cet immense pays varient d'une région à une autre. La flore algérienne telle qu'elle a été décrite autrefois par de nombreux auteurs, entre autres, (COSSON, 1879 ; QUEZEL & SANTA, 1962 ; LE HOUEROU, 1995) a beaucoup changé dans le temps, en conséquence des impacts conjugués des changements climatiques et des activités anthropiques. Cependant, plusieurs projets de recensement ont essayé d'inventorier le cortège floristique de l'Algérie, mais les résultats obtenus restent incomplets et manquent de précision. De plus, les essences forestières naturelles sont localisées dans les régions septentrionales et se raréfient au fur et à mesure qu'on se déplace vers les zones désertiques (figure 03).

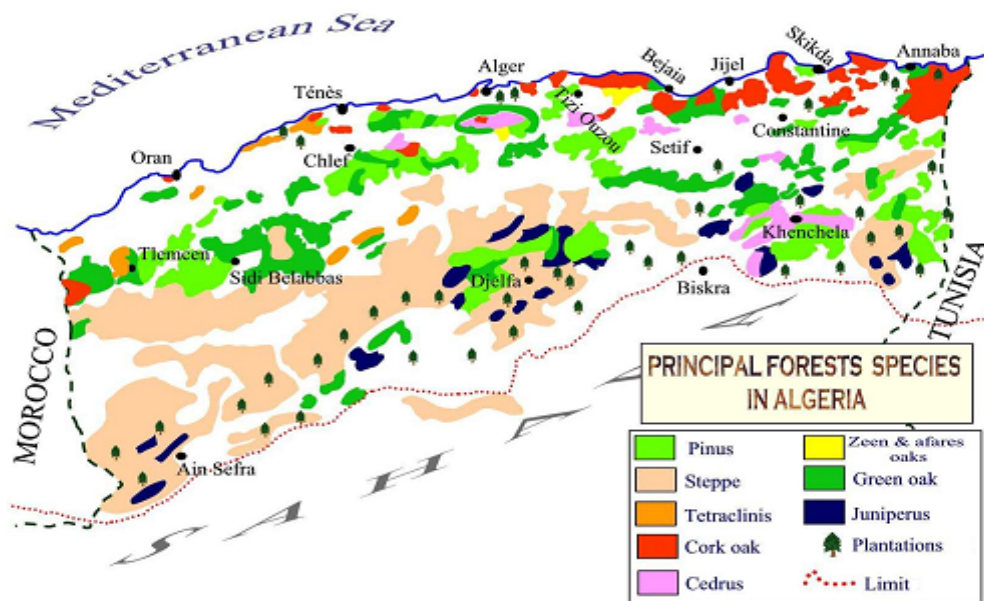


Fig. 03 – Carte des groupes de végétations (INRF, 2012)

Chapitre I _____ ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES CUPRESSACEES

En Algérie, les cupressacées ne représentent que des essences forestières de protection (INRF, 2012). En outre, dans une étude comparative des essences forestières du pourtour méditerranéen, Quézel (1979) a signalé la présence de quatre espèces dans la famille des cupressacées (Tab 02).

Tab. 02 – Les essences forestières du bassin méditerranéen (Quézel, 1979).

Pays	Pinus	Abies	Cedrus	Cupressacées	Quercus	Autres feuillus majeurs
France	5	1	-	3	8	3
Espagne	5	2	-	4	10	2
Maroc	3	1	1	5	8	-
Algérie	3	1	1	4	8	-
Grèce	6	3	-	6	10	4
Turquie	5	4	1	6	15	4
Syrie	2	1	1	3	9	2

Toutefois, les données du tableau 02 indiquent la présence de quatre cupressacées ; alors que dans d'autres travaux d'exploration et d'inventaire on cite trois genres et six espèces. Il s'agit de : (Thuya) *Tetraclinis articulata*, (Cyprés) *Cupressus sempervirens*, *C. dupreziana* et (Genévrier) *Juniperus phoeniceae*, *J. oxycedrus*, *J. communis*, *J. thurifera*, et *J. sabina* aussi (tableaux 03 et 04).

Tab. 03 – Espèces arborées des montagnes d'Algérie (INRF, 2012).

Taxons	Distributions	Observations
<i>Abies numidica</i>	Forêts humides des hautes montagnes des Babors	Endémique, très rare, menacé
<i>Cedrus atlantica</i>	Montagnes de 1400 à 2600 m d'altitude	Endémique algéro-marocaine, rare, menacé
<i>Cupressus dupreziana</i>	Tassili n'Ajjer	Endémique, très rare, en voie de disparition
<i>Juniperus communis</i>	Pelouse et rocaille des hautes montagnes des Aurès	Rare, menacé
<i>Juniperus oxycedrus</i>	Littoral, collines et montagnes	Menacé
<i>Juniperus sabina</i>	Rochers des hautes montagnes du Djurdjura	Très rare, menacé
<i>Juniperus thurifera</i>	Pelouse sèche des hautes montagnes des Aurès	Rare, menacé
<i>Juniperus turbinata</i>	Dunes littorales, Atlas saharien	Menacé
<i>Pinus halepensis</i>	Du littoral aux montagnes de l'Atlas saharien	
<i>Pinus mauretanica</i>	Montagnes du Djurdjura (Tikjda)	Très rare, menacé
<i>Pinus pinaster</i>	Forêts humides du littoral jusqu'à 800 m d'altitude	
<i>Taxus baccata</i>	Monts de Kabyle et des Aurès	Assez rare en voie de disparition
<i>Tetraclinis articulata</i>	Collines et basses montagnes du sub-humide et semi-aride	

Tab. 04 - Les superficies en Ha par décennie des principales essences forestières en Algérie (Mellaoui-Murzeau, 2013).

Essences	Boudy (1955)	Service des forêts (1966)	Admini Des Forêts (1978)	Seigue (1985)	Ghazi el Lahouati (1997)	RNE ¹ (2000)	DGF ² (2007)
Pin d'Alep	852000	792000	792000	855000	800000	881000	881000
Chêne liège	426000	463000	468000	440000	463000	229000	230000
Chêne vert	679000	354000	354000	680000	354000	219000	108000
Chêne zeen et afarès	-	65000	65000	67000	65000	48000	48000
Genévrier de Phénicie	279000	227000	277000	-	217000	-	-
Thuya	157000	191000	143000	160000	143000	-	-
Cèdre de l'Atlas	45000	23000	23000	30000	12000	16000	16000
Pin maritime	-	12000	12000	12000	38000	32000	31000
Sapin de Numidie	-	-	-	300	-	-	-
Maquis	780000	78000	-	-	-	-	1662000

¹ : Rapport National sur l'Environnement

² : Direction Générale des Forêts

IV. LES CUPRESSACEES DANS L'ATLAS ALGERIEN

L'Algérie est traversée dans sa largeur, d'ouest en est, par deux chaînes montagneuses parallèles (Atlas tellien et Atlas saharien) appartenant au massif montagneux de l'Afrique du nord. L'Atlas tellien comprend les monts de Tlemcen (1843 m), monts du Tessala (1061 m), Atlas blidéen (1629 m), le massif de l'Ouarsenis (1 985 m), le Dahra (1 550 m), les monts de la Grande Kabylie (Djurdjura 2308 m), les Bibans (1845 m), les Babors (2004 m), etc. Il s'étend sur 1500 Km de la frontière marocaine où il prolonge l'Atlas saharien à la frontière tunisienne. Ce dernier, de direction Sud-Ouest-Nord-Est et d'une longueur de 700 Km, comprend plusieurs monts : monts des Ksour (2236 m au Djebel Aïssa), djebel Amour (2008 m), monts des Ouled-Naïl (1491 m), le massif de l'Aurès (2328 au Djébel chélia), les monts des Némémchas et de Tébessa, etc. ([https://fr.wikipedia.org/wiki/Atlas_\(massif\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Atlas_(massif))).

Les explorations botaniques faites par de nombreux auteurs (Quézel & Santa et Le Houérou, ...) montrent bien la richesse et la diversité floristique de l'Algérie. Cependant, l'abondance du couvert forestier se trouve influencée par plusieurs facteurs (altitude, bioclimat, action anthropique, catastrophes naturelles, etc.) ; ainsi, les groupements forestiers

Chapitre I _____ ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES CUPRESSACEES

des deux atlas varient d'un secteur à un autre, voire même au sein d'un même secteur c.à.d. d'un district à un autre (Meddour, 2010). Parmi les peuplements forestiers de l'atlas algérien qui nous intéressent ce sont bien les cupressinées. Ces dernières, se rencontrent sur les deux massifs de l'atlas algérien à des taux de recouvrement variables, soit en association avec d'autres végétaux ou bien formant des peuplements clairsemés et isolés.

En effet, le thuya de berbérie, *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master, est une cupressacée quasiment endémique de l'Afrique du nord ; elle occupe des stations Xérothermophiles où les précipitations varient entre 300 et 600 mm (INRF, 2012). Cette espèce est assez largement présente dans les secteurs : algéro-ouarsenien, orano-tlemcenien. Selon Boudy (1955), le thuya de berbérie occupait autrefois près de 161000 ha (Meddour (2010) ; Miara (2011)). Actuellement, ce groupement occupe 72.300 ha (INRF, 2012).

Par ailleurs, peu de données sont fournies quant à la répartition sectorielle et du peuplement du cyprès. Les espèces endémiques ou naturalisées du cyprès sont : le cyprès du Tassili (*Cupressus dupreziana* A. Camus), le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen), le cyprès toujours vert (*Cupressus sempervirens* L.). Le cyprès de l'Arizona (*Cupressus arizonica* Greene) est une espèce introduite et pas très utilisée (Nichane, 2015). Ces espèces tolèrent bien les conditions d'un milieu xérothermique. Le cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) est le plus répandu. Il offre une très grande diversité notamment en terme de forme et est utilisé à des fins ornementales, en brise-vent ou encore en tant qu'arbre forestier ; tandis que, le cyprès de Duprez (*Cupressus dupreziana* A. Camus) se rencontre naturellement dans le désert du Tassili N'Ajjer (Algérie) et représente une des espèces rares et menacées. Un récent inventaire fait état de 231 arbres survivants dans cette région désertique où la pluviométrie annuelle est d'environ 20 mm (Pichot & Maataoui, 2000).

En revanche, le genévrier constitue une essence forestière dite de protection. Selon Louni (1994), il existe en Algérie trois espèces de genévrier (genévrier de phénicie, genévrier oxycèdre et genévrier thurifère). Le genévrier de phénicie occupe les dunes maritimes en Oranie, les montagnes les plus sèches où il constitue des matorrals dans les Aurès et l'Atlas saharien. Par ailleurs, Boudy (1955) a estimé la superficie occupée par *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* à 290 000 ha ; alors que dans un inventaire plus au moins récent (1984), la superficie de ces deux espèces n'est que de 17 504 ha, ce qui confirme les propos de certains auteurs affirmant que certaines espèces de cette essence sont dans un stade ultime de

dégradation et que *Juniperus thurifera* représente une espèce rare (Harfouche et al., 2005). En plus, il existe une quatrième espèce qui est le genévrier commun appelé *Juniperus communis* que l'on peut rencontrer avec le *J. thurifera* et *J. phoenicea* dans les monts de Djurdjura (Meddour, 2010).

V. CLASSIFICATION SYSTEMATIQUE DES CUPRESSACEES

Les Cupressaceae s.l. ont longtemps été divisés en deux familles, les Cupressaceae s.s. : *Cupressus*, le cyprès ; *Juniperus*, le genévrier et les taxodiaceae : *Sequoia* et *Sequoia-dendron* sur la base des différences morpho-anatomiques de leurs feuilles (figure 04). Cependant, de nombreux caractères plaident pour des caractères dérivés communs et pour leur monophylie. Les cônes femelles, formés d'écailles épaisses et dures, axillent des ovules au nombre de 2 à 3 (*Thuja*) ou davantage (*Cupressus*). *Cupressus sempervirens* (cyprès) présente un cône femelle sphérique (Amirouche et al., 2010).

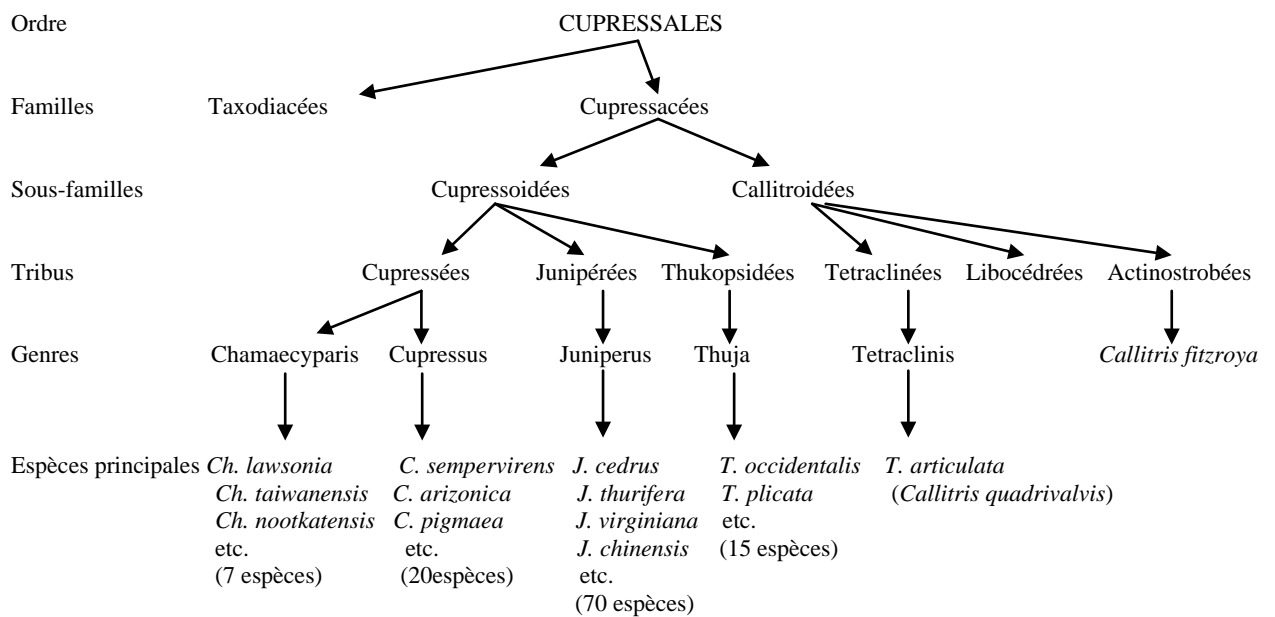


Fig. 04 – Classification détaillée de l'ordre des Cupressales (Haluk & Roussel, 2000)

VI. SYSTEMATIQUE ET DESCRIPTION BOTANIQUE DES ESPECES SELECTIONNEES

Les genres Genévrier (*Juniperus*) et Thuya (*Callitris*) sont les seuls représentants des cupressacées spontanées en Algérie, alors que ; les Cyprès (*Cupressus*) sont fréquemment cultivés. En outre, les Genévriers Oxycèdre et de Phénicie sont abondants dans le secteur saharo atlasique (monts des Ksours, Djebel Amour, monts des Ouleds Nail, monts des Zab).

Les genévriers représentent des espèces pionnières peu exigeantes sur le plan écologique. Ce sont des arbres ou arbrisseaux très rameux, exploités pour le bois ou le feuillage, voire à des fins industrielles ou médicinales (Quézel, 1962). La floraison est généralement dioïque pour le Genévrier de Phénicie et monoïque pour celui de l'Oxycèdre. Les chatons mâles petits et jaunâtres, tandis que les chatons femelles formés d'écailles verdâtres, qui deviennent charnues et se soudent entre elles pour former des fruits appelés baies ou galbules (Lapie & Maige, 1914 ; Meddour, 2010).

VI.1. Systématique du genévrier de Phénicie

Embranchement: Spermaphytes

Sous- Embranchement: Gymnospermes

Classe: Conifères

Ordre: Coniférales

Famille : Cupressacées

Genre: *Juniperus*

Espèce: *Juniperus phoenicea* L. (Quezel et Santa, 1962).

VI.2. Description botanique du genévrier de Phénicie

Le Genévrier de Phénicie ou genévrier rouge (*J. phoenicea* L.) est un arbrisseau touffu ou un arbuste de 1 à 3 m de hauteur mais pouvant atteindre cependant jusqu'à 8 à 10 mètres. Au jeune âge, certaines feuilles sont en aiguilles et d'autres en écailles très petites, très imbriquées, opposées, formant le feuillage vert persistant de l'arbre après les premières années. Le fruit globuleux devient rouge et luisant à maturité (figure 05 : a, b, c et d). Cette espèce est indifférente au substrat ; elle est présente en bioclimat surtout semi-aride et aride en ambiance nettement continentale se contentant de précipitations comprises entre 200 et 400 mm (Lapie & Maige, 1914 ; Quézel, 1962).



Fig. 05 (a) – Arbre de *J. phoenicea*



Fig. 05 (b) – Feuilles en écailles

de *J. phoenicea* (loupe x20)



Feuilles en écailles

Baie rouge

Fig. 05 (c) – feuilles et baie de *J. phoenicea*

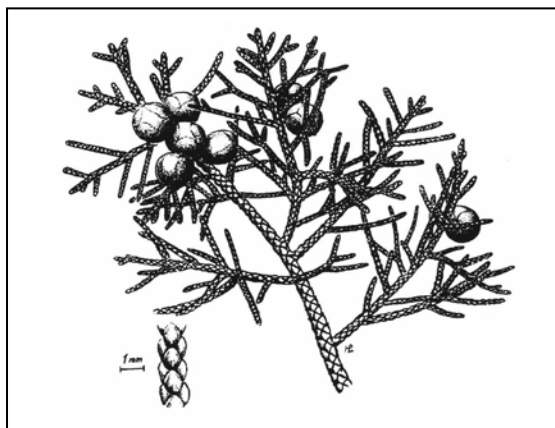


Fig. 05 (d) – Feuilles et baies de *J. phoenicea* (Quézel, 1962)

VI.3. Systématique du genévrier oxycède

Embranchement: Spermaphytes

Sous- Embranchement: Gymnospermes

Classe: Conifères

Ordre : Coniférales

Famille: Cupressacées

Genre : Juniperus

Espèce: *Juniperus oxycedrus* L. (Quezel et Santa, 1962).

VI.4. Description botanique du genévrier oxycède

Le Genévrier Oxycède (*J. oxycedrus* L.) est un arbrisseau ou un petit arbre dressé, à feuilles par trois, terminées en pointe aigue, marquées au-dessus de deux bandes blanchâtres séparées par la nervure médiane verte. Les fruits sont rouges et luisants à maturité (8 à 10 millimètres) (figure 06 : a, b et c). Comme le genévrier de Phénicie, il colonise également les dunes littorales où il est représenté par un type particulier à gros fruits et à feuilles plus larges (*J. macrocarpa* Sibth Sm.).

Le Genévrier Oxycède est peu exigeant pour le sol, il s'observe surtout sur calcaires, aux étages méso et supra-méditerranéens, en bioclimat sur-humide. Il peut apparaître très localement en bioclimat semi-aride. Cette espèce est très répandue en Algérie. Son bois homogène et à grain fin est employé en ébénisterie et pour la fabrication des crayons. Il est assez apprécié pour le chauffage et donne un charbon de bonne qualité. On en extrait, par distillation, l'huile de Cade, produit pharmaceutique (Lapie & Maige, 1914 ; Quézel, 1962).



Fig. 06 (a) – Arbre de *J. oxycedrus*

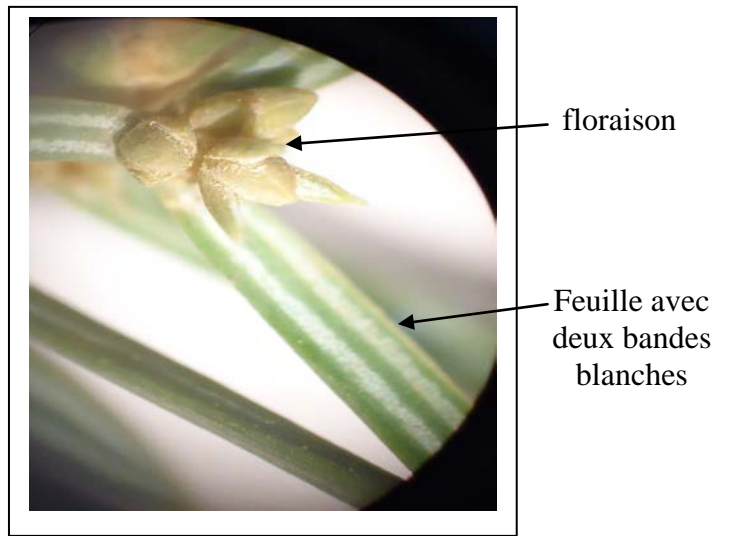


Fig. 06 (b) – Feuilles de *J. oxycedrus* (loupe x 20)



Fig. 06 (c) – Feuilles et baies de *J. oxycedrus* (Quézel, 1962)

VII. UTILISATION DES ESPECES ETUDIEES EN MEDECINE TRADITIONNELLE

Le recours au genévrier en médecine populaire se pratique depuis fort longtemps. De nos jours, l'usage de cette plante connaît un nouvel essor avec l'aromathérapie (Chevallier, 1997). Les propriétés médicinales du genévrier justifient des modes d'administration variés, adaptés aux usages internes et externes, allant des frictions aux fumigations, en passant par les gargarismes, les poudres et les boissons diverses. Toutes les parties de la plante sont utilisées, mais de préférence les baies. En effet, les feuilles de *Juniperus phoenicea* sont utilisées sous forme de décoction pour soigner le diabète, diarrhée et rhumatisme alors que les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès. De plus, il possède des propriétés diurétiques mises à profit pour combattre toute sorte de maladies du système urinaire (infections et inflammations, calculs, goutte, etc.) (Stark et al., 2013).

Enfin, le genévrier fut grandement apprécié pour ses propriétés antiseptiques. L'huile de cade, extraite par distillation du bois de *Juniperus oxycedrus*, fut d'une aide précieuse pour lutter contre les dermatoses et divers parasites (gale, teigne, herpès, eczéma, acné ou psoriasis) (Bertaudière-Montes et Montès, 2004; Bhar & Balouk, 2011).

VIII. RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ETUDES DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DES ESPECES ETUDIEES

Les huiles essentielles du genre *Juniperus*, connues depuis l'antiquité, sont généralement extraites par distillation et sont le résultat d'un mélange complexe et variable de divers composés tels les terpènes et les phénols (Bertaudière-Montes et Montès, 2004).

La composition de l'huile essentielle de *J. oxycedrus* est dominée par l' α -pinène (41,3%), des quantités modérées de phellandrène, p-cymène, phellandrène, limonène, myrcène, terpineol, (E)-nerolidol et d'oxyde manoyl. Par contre, *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* contient beaucoup de sabinène (26,5%) et de l' pinène (22,6%). L'huile de *J. oxycedrus* ssp. *badia* est riche en pinène (20,7%), mais contient moins de sabinène (0,1%) ; alors qu'elle possède des quantités importantes d'oxyde manoyl (10,9%) (Adams, 2000).

Par ailleurs, La composition des huiles essentielles des feuilles de la section *Juniperus* est généralement beaucoup plus simple et dominée par les monoterpènes simples, contrairement aux huiles essentielles de la section *Sabina*, où les monoterpènes oxygénés (par exemple le

camphre) et les sesquiterpènes (par exemple cadinols, Cedrol) sont les composés majoritaires (Adams et *al.*, 2005).

Les principaux constituants des huiles essentielles de *J. oxycedrus* sont des hydrocarbures terpéniques, en particulier pinène α , myrcène et germacrène D dans les huiles des baies et α -pinène, β -phellandrène et Δ 3-carène dans les huiles des feuilles. Bien que ces huiles sont généralement caractérisées par une teneur élevée en α -pinène, quelle que soit la sous-espèce et son origine, plusieurs compositions peuvent être distinguées en fonction du contenu et de l'abondance en d'autres composés. Par exemple, en ce qui concerne les huiles des feuilles, les compositions rapportées sont les suivantes: *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (ou sous-espèce non précisée), α -pinène (Portugal, Sardaigne et Croatie) α -pinène / Δ 3-carène (Portugal, Espagne); α -pinène / limonène (Italie, Grèce); α -pinène / limonène / α -terpinyl acétate / β -caryophyllène (Italie); α pinène / -phellandrene / terpinolène (Grèce), germacrène D et de l'oxyde de manoyl (extrait par CO₂ supercritique, Sardaigne); pour *J. oxycedrus* ssp. *badia* et riche en α -pinène / germacrène D / oxyde de manoyl (Espagne). La troisième sous-espèce *J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa*, α -pinène (Italie), α -pinène / α -terpinéol (Italie); α - pinène / sabinène (Espagne) (Boti et *al.*, 2006) , germacrene D (Algérie) (Djebaili et *al.*, 2013).

La composition des huiles des baies et dominée par: α -pinène (*J. oxycedrus* ssp. *macrocarpa* (Italie), *J. oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (Portugal et Italie, des sous-espèces non spécifiées de la Croatie, Grèce et Espagne); α -pinène / myrcène (Italie); le myrcène / α -pinène / γ -cadinène (Crète) ou myrcène / citronellol / α -pinène (Grèce); sesquiterpènes (*J. oxycedrus*, Espagne); germacrène D / pinène / myrcène (extrait par le CO₂ supercritique, Sardaigne) (Boti et *al.*, 2006).

Par ailleurs, la teneur en composés majoritaires des huiles essentielles de *J. phoenicea* L. de plusieurs origines est très variable (Adams et Boratynski, 2014). Les huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et baies) sont riches en : α -pinène / δ 3-carène (Maroc), α - pinène / p-cymène / β -phellandrène / α -acétate de terpényle (Tunisie), α -pinène / myrcène / β -phellandrène (Grèce et Espagne) (Akrouf, 1983) ; α -pinène / α -phyllandrène / myrcène / β -pinène / linalool / piperitone / γ -terpinène / Trans-pinocarveole / ρ -cymène / α -terpineol / γ -cadinène (Maroc) (Derwich et *al.*, 2010). Celles de l'Algérie sont dominées par : α -pinène / β -phellandrène / α - acétate de terpényle (Mazari et *al.*, 2010) ; α -pinène / δ 3- carene / linalool (Bakchiche et *al.*, 2014) ; α -pinène / terpinolène / Δ 3-carène / β -phellandrène (Ramdani et *al.*, 2013).

Enfin, l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* ssp. *turbinata* de la Corse est dominée par : α -Pinène, β -phellandrène, α – acétate terpényle, Δ -3-carène, myrcène et α - phellandrène (Rezzi et *al.*, 2001).

IX. CONCLUSION

Les cupressacées représentent une famille d'essences forestières intéressantes sur les plans : écologique et socio-économique. Néanmoins, les travaux d'exploration et d'inventaire, malgré insuffisants et imprécis, ont fait constat d'un recul du nombre de peuplements forestiers naturels conséquent à de multiples facteurs (activités anthropiques, changements climatiques, catastrophes naturelles, incendies, etc.).

Le genre *Juniperus* est l'un des représentants de cette famille de résineux qui existe en Algérie. Il possède une composition chimique très riche en composés chimiques aux vertus médicinales.

Par ailleurs, les monts Ksouriens de l'Atlas saharien contiennent encore quelques peuplements de genévrier : genévrier de phénicie et genévrier oxycèdre qui n'ont jamais été sujets d'études publiées pour la caractérisation de leurs huiles essentielles.

Chapitre II* — *RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I. LES HUILES ESSENTIELLES

I.1. Historique

L'utilisation des plantes aromatiques (l'aromathérapie) était à l'origine partie de la médecine à base de plantes. La phytothérapie remonte à des milliers d'années et ne se limite pas à une seule région géographique. Presque chaque partie du monde a une histoire de l'utilisation de composés aromatiques dans son système de soins de santé.

Les huiles essentielles ont été utilisées tout au long de l'histoire pour une grande variété d'applications de bien-être. Il semble que les Egyptiens étaient quelques les premiers à utiliser les huiles essentielles aromatiques dans la pratique médicale, soins de beauté, la préparation des aliments, et les cérémonies religieuses. Encens, bois de santal, de la myrrhe et de la cannelle ont été considérés comme des marchandises très précieuses, parfois échangées contre de l'or.

Par ailleurs, les Grecs utilisaient des huiles essentielles dans leurs pratiques de massage thérapeutique et de l'aromathérapie. Les Romains puis les chinois et les indiens ont également utilisé des huiles aromatiques pour promouvoir la santé et l'hygiène personnelle. Les Perses ont commencé à affiner les méthodes de distillation pour extraire les huiles essentielles de plantes aromatiques. Les extraits d'huiles essentielles ont été utilisés à travers les âges sombres en Europe pour leurs propriétés antibactériennes et odorantes (Buckle, 1997).

I.2. Définition et rôle écologique des huiles essentielles

Le terme huiles essentielles, également appelées huiles volatiles ou huiles éthérées, est utilisé pour désigner les extraits de plantes aromatiques. Il s'agit d'un mélange de nombreux composants tels que les terpènes, les amines, le soufre, les composés halogénés (chez les algues marines), les hydrocarbures non terpéniques, et d'autres (les acides, les alcools, les aldéhydes, les phénols, etc.) (Ramawat & Mérillon, 2013).

Ce sont des composés à faible solubilité dans l'eau, mais solubles dans les graisses, l'alcool, les solvants organiques et d'autres substances hydrophobes et sont généralement liquides à température ambiante. Ils sont stockés dans des cellules spécialisées des plantes, généralement des cellules sécrétrices ou des conduits (les conduits à résine), des glandes ou trichomes (poils glandulaires) et peuvent être extraites des feuille, fleurs, bourgeons, graines, fruits, racines, bois ou de l'écorce des plantes par différentes méthodes, y compris l'extraction par solvant et

Chapitre II — RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

fluide supercritique, expression sous pression, fermentation ou enfleurage, mais aussi à la vapeur basse ou haute pression ou hydrodistillation. Les huiles essentielles sont souvent décrites comme des métabolites secondaires des plantes. Traditionnellement, les métabolites secondaires sont des composés synthétisés par la plante et qui ne semblent pas être essentiels pour la croissance et le développement des plantes; mais semblent ils avoir un rôle dans le système de défense des plantes contre les herbivores animaux et microbiens (Thormar, 2011). Ils sont aussi impliqués dans l'attraction des insectes pollinisateurs et le système de communication (allélopathie) au sein du monde végétal (Buckle, 1997).

I.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des composés simples ou même de simples mélanges de plusieurs composés individuels. Elles peuvent contenir jusqu'à environ 100 composants, bien que la plupart d'entre elles contiennent environ 20 à 60. Les composés qui constituent les huiles essentielles sont principalement des terpènes presque 1000 monoterpènes et 3000 sesquiterpènes. Les phénylpropanoïdes, au nombre de 50, et d'autres composés (acides, alcools, aldéhydes, phénols, etc.) peuvent être présents, mais à des proportions plus petites (Buckle, 1997 ; Thormar, 2011 ; Ramawat & Mérillon, 2013).

La classification et la nomenclature des composés des huiles essentielles est compliquée, du fait que ses composés ont été isolés et étudiés avant l'instauration de la nomenclature chimique systématique. Par conséquent, beaucoup de ses composés sont connus par des noms non systématiques se référant à leurs origines botaniques tels que : l'eucalyptol, le limonène, le pinène et le thymol (Thormar, 2011).

1.3.1. Les terpènes

Les terpènes dérivent de la voie de l'acide mévalonique. Ce des composés constitués d'unités isoprène. Chaque unité isoprène est formée de cinq atomes de carbone. Les monoterpènes ont deux unités isoprène, sesquiterpènes ont trois, diterpènes ont quatre et ainsi de suite pour le reste (figure 07). Les molécules monoterpéniques ont de faibles poids moléculaire et s'évaporent rapidement. Elles s'oxydent facilement pour donner des alcools terpéniques, tandis que les terpénoïdes représentent des terpènes oxygénés (Buckle, 1997).

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

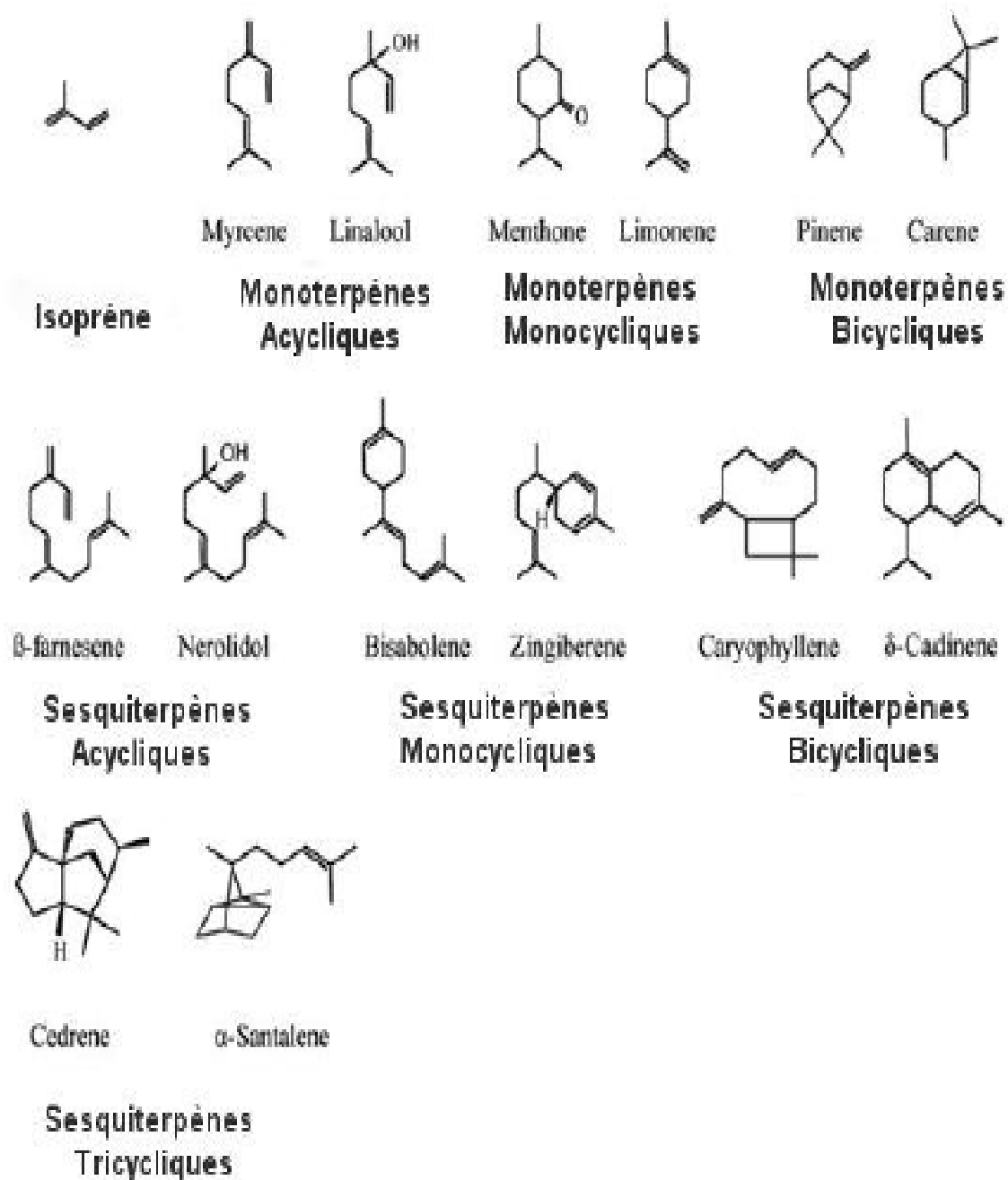


Fig. 07- Structure de quelques composés terpéniques (Guitton, 2010)

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

1.3.2. Les phénylpropanes

Les phénylpropanes dérivent de la voie de l'acide shikimique pour produire des composés phénoliques qui comprennent des cycles benzéniques. Cette voie produit également des alcaloïdes comme la morphine (Buckle, 1997).

Les dérivés du phénylpropane (figure 08) sont moins fréquents que les terpènes et leurs dérivés. On peut rencontrer dans ce groupe des allyl- et propénylphénols, parfois des aldéhydes (anéthole, anisaldéhyde, apiol, méthyl-chvicol (=estragole) et d'autres composés tels que (eugénol, safrole, asarones, cinnamaldéhyde, etc.). de plus, les huiles essentielles peuvent contenir des composés en C₆-C₁ comme la vanilline et l'anthranilate de méthyle. Par ailleurs, les lactones dérivées des acides cinnamiques (des coumarines) peuvent être entraînés par la vapeur d'eau lors de l'extraction des huiles essentielles (Bruneton, 2009).

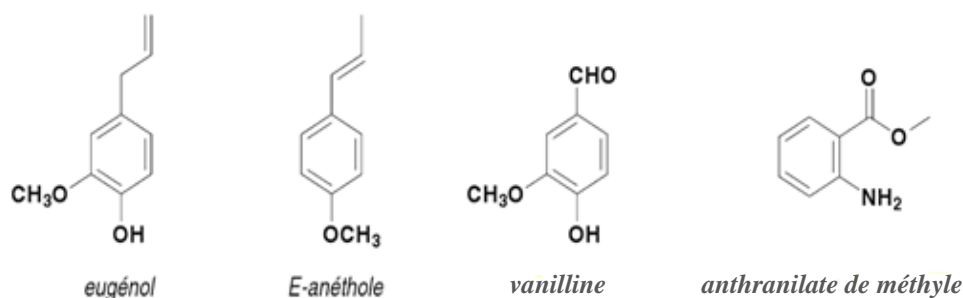


Fig. 08 - Structure de quelques dérivés des phénylpropanes (Bruneton, 2009).

I.4. Contrôle de qualité

La composition chimique et la teneur des plantes en huiles essentielles sont fonction de plusieurs facteurs qui peuvent affecter la qualité de ces dernières. Effectivement, la composition chimique de toutes les plantes vivantes dépend du climat et des conditions environnementales (tels que les précipitations, l'ensoleillement, l'acidité du sol, altitude, etc.) et de la pollution. Cependant, la façon la plus simple pour être sûr de la composition de l'huile essentielle est d'utiliser des méthodes d'analyse modernes, telles que la chromatographie en

Chapitre II* — *RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

phase gazeuse (CG) ou de préférence la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) (Buckle, 1997).

I.5. Caractéristiques économiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont recherchées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques. On les retrouve sur les marchés de l'aromathérapie, de la parfumerie et de la cosmétique.

La consommation des huiles essentielles est mondiale, par contre leur production et leur commercialisation sont dominées par certains pays de puissance dans ce domaine; tels que, États-Unis, l'Europe de l'Ouest, le Japon et le Canada. Les États-Unis (50%) représentent le plus grand marché des huiles essentielles et plus particulièrement les huiles de pin. En Europe, l'Allemagne constitue le plus grand marché (20 %), suivi par la France (18 %), le Royaume-Uni (16 %), l'Italie (14 %) et l'Espagne (10 %) (Ngakegni-limbili, 2012). Ce sont des centres de collection et de distribution ainsi que Brème, Amsterdam et Anvers (Herzi, 2013). En Afrique, les quantités produites sont très faibles et les besoins sont compensés par des volumes importants importés à travers le monde, excepté l'Afrique du Nord où les pays du Maghreb (Maroc et Tunisie principalement) sont les leaders dans cette région. Par ailleurs, les Comores et Madagascar font partie des grands producteurs mondiaux qui exportent leur production (Ngakegni-limbili, 2012).

Enfin, le marché des huiles essentielles est en plein croissance et la plupart de ces biens économiques ne sont pas produits localement à cause des contraintes de coût, de climat et des conditions géographiques de certaines régions.

I.6. Activité biologique des huiles essentielles

En dépit de leur histoire d'être considérées comme, métabolites secondaires, il devient clair que les huiles essentielles et leurs composants ont des fonctions biologiques spécifiques, dont beaucoup se prêtent à une exploitation commerciale. La diversité et la complexité des composés présents dans les huiles essentielles, offrent à ces dernières la capacité d'affecter de nombreux systèmes biologiques. Les activités biologiques des plus grands centres d'intérêt figurent autour des applications dans la santé, l'agriculture et l'industrie cosmétique et alimentaire. Dans le domaine de la santé et de la médecine, les huiles essentielles ont un large

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

éventail de propriétés biologiques, telles que antimicrobienne, anticancéreuse, analgésique, antioxydante, anti-inflammatoire, d'autres possèdent des effets immuno-modulateurs et antiplaquettaire, et les activités anti-thrombotiques (tableau 05) (Thormar, 2011).

Tab. 05 – Propriétés de quelques composés des huiles essentielles (Buckle, 1997)

Composés	Propriétés
Δ -Limonène	Anti-tumoral
Myrcène	Analgésique
β -Caryophyllène	Anti-inflammatoire
Linalool	Sédatif
Géraniol	Antifongique
Terpinèn-4-ol	Actif contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Farnesol	Actif contre <i>Trichomonas vaginalis</i>
Thymol	Actif contre <i>Cryptococcus neoformans</i>
Eugénol	Sédatif et vasodilateur
Carvacrol	Anti convulsif et antibactérien
Citronellal	Antifongique et insecticide
Acétate de géranyle	Stimule la production biliaire
1,8 cinéole	Anti-inflammatoire et expectorant
Népetalactone	Analgésique et sédatif
Coumarine	Antispasmodique
Trans-anéthole	Activité œstrogénique

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I.7. Phénomènes physico-chimiques et température

La composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. En effet, elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol, climat, lumière, etc.), ou technologiques (mode de culture, séchage, stockage ou d'extraction) (Figueredo, 2007).

En effet, lors de l'extraction des huiles essentielles les constituants de l'essence native sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur, et peuvent subir des modifications chimiques. Par conséquent, 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 faible. La matière chimique fait l'objet de réactions chimiques diverses : 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. Parmi les constituants sujets aux modifications, on trouve plus particulièrement les monoterpènes mono et bicycliques (ex: sabinène), les alcools monoterpéniques et leurs esters (ex: linalol et son acétate) (Hernandez Ochoa, 2005).

II. LES TECHNIQUES D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

Il existe plusieurs méthodes traditionnelles et modernes pour extraire les composants volatils à partir des plantes. Certaines techniques extraient des huiles essentielles, alors que d'autres produisent différents extraits plutôt que des huiles essentielles (figure 09) (Buckle, 1997).

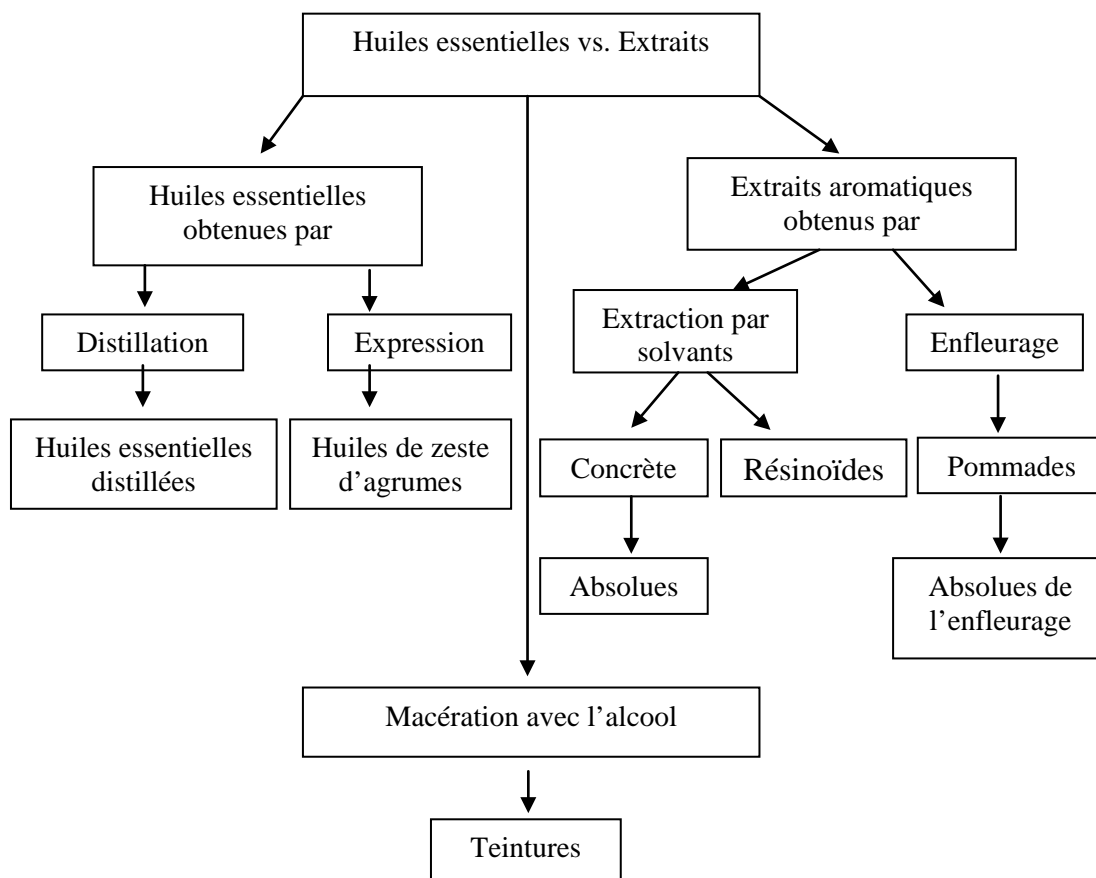


Fig. 09 – Techniques d'extraction des huiles essentielles et extraits (Buckle, 1997).

II.1. Entraînement à la vapeur d'eau 'ex-situ' ou vapo-hydrodistillation

Dans la distillation à la vapeur d'eau, la vapeur est soufflée dans le mélange d'eau et le matériel végétal. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de la vapeur se fait à la base de l'alambic (figure 10).

Cette méthode d'extraction minimise les altérations hydrolytiques de l'essence. Néanmoins, les molécules aromatiques extraites peuvent subir des modifications sous l'effet de l'oxygène (oxydation, hydrolyse, restructuration) (Duval, 2012).

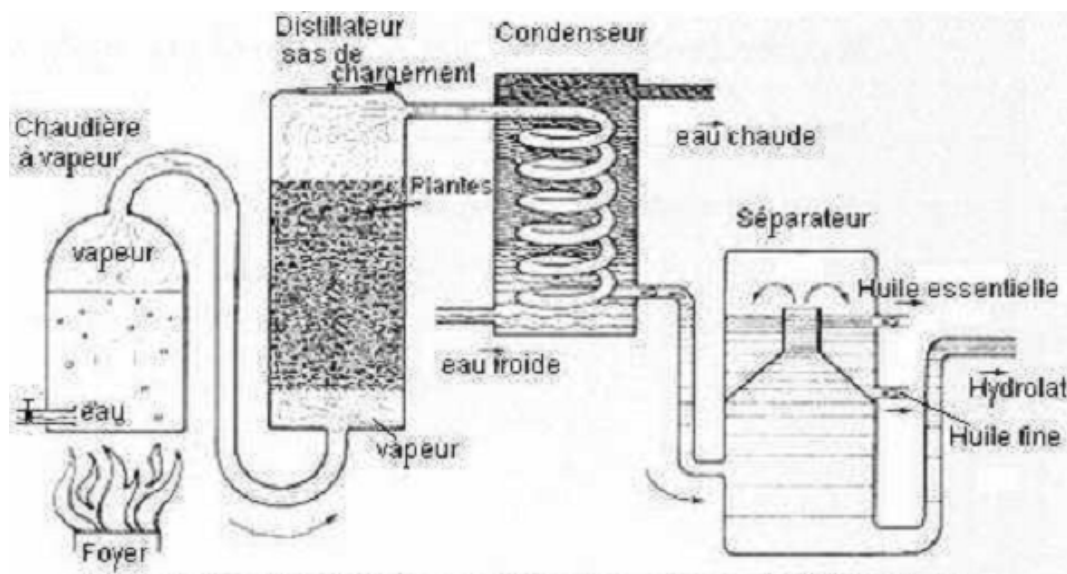


Fig. 10 – Montage d'extraction par entraînement à la vapeur (Duval, 2012)

II.2. Entraînement à la vapeur d'eau 'in-situ' ou hydrodistillation

Le matériel végétal est en contact direct avec l'eau bouillante (figure 11). Cependant, une telle méthode de chauffage direct peut conférer à l'huile essentielle une odeur de brûlée. La plupart des alambics de distillation ont une grille. Cela protège le matériel végétal des éléments de chauffage, et le processus est similaire à celui de la distillation à la vapeur d'eau.

Les techniques de distillations ont l'avantage d'être des méthodes économiques, traitant des quantités énormes de matière végétale, ne procurant que de simples appareillages et ne nécessitant que peu de main d'œuvre. Cependant, elles ont l'inconvénient de modifier la composition native des constituants des huiles essentielles et dépendent beaucoup du couple temps/température (Buckle, 1997).

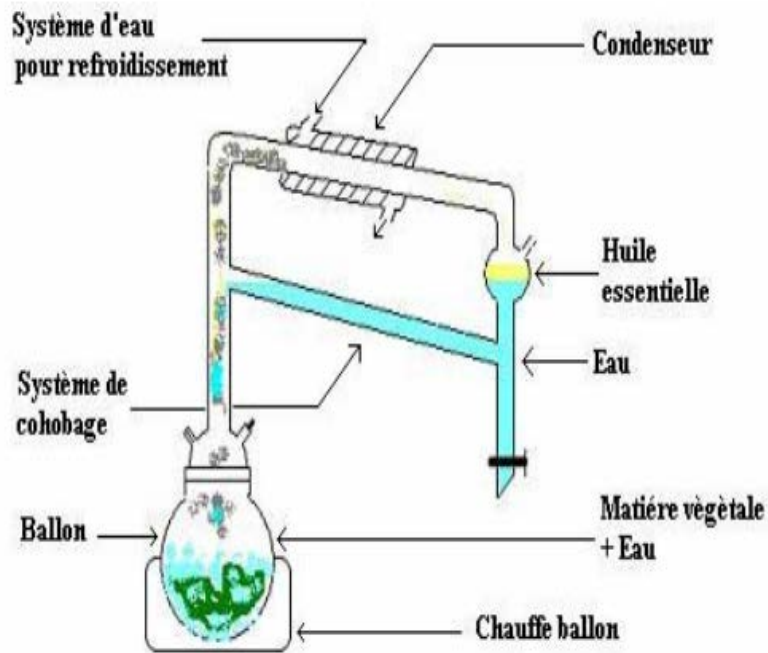


Fig. 11 - Montage d'hydrodistillation (Hernandez Ochoa, 2005)

II.3. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes consiste à introduire le réacteur contenant le matériel végétal (avec ou sans eau) dans un four à micro-ondes (figure 12).

La technologie de l'utilisation des micro-ondes représente une alternative aux techniques de distillation pour améliorer les rendements, la vitesse de 'extraction et être appliquée à de plus grands volumes (Duval, 2012).

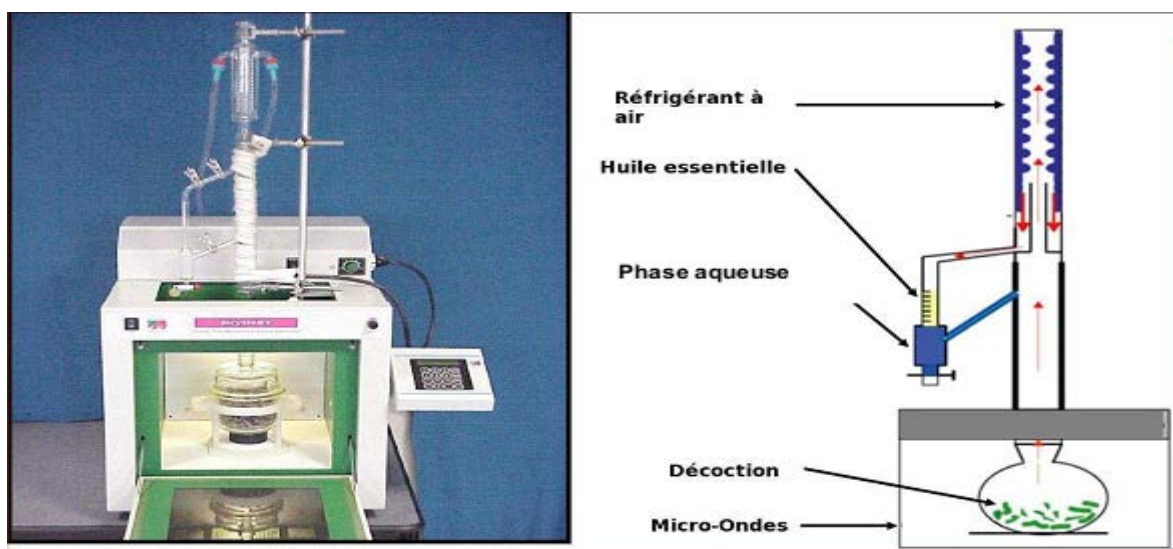


Fig. 12 – Dispositif de l'extraction assistée par micro-ondes (Duval, 2012)

II.4. Expression à froid

La technique d'expression à froid est destinée pour le traitement de la peau des plantes d'agrumes (figure 13). La peau du fruit est épluchée ou abrasée par des racleurs mécaniques, et l'essence est recueillie par séparateur centrifuge.

Parfois, le fruit entier est broyé avant que l'huile essentielle ne soit séparée du jus et de l'écorce. Les huiles obtenues contiennent naturellement une proportion de cires et d'autres composants non solubles qui peuvent causer la photo-toxicité (Buckle, 1997).



Fig. 13 – Extraction par expression à froid (Beneteaud, 2011)

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

II.5. Enfleurage (extraction par la graisse froide)

Cette technique a été conçue principalement pour les fleurs fragiles comme le jasmin et la tubéreuse. Cependant, elle est rarement utilisée aujourd'hui. La graisse animale est pilonnée jusqu'à ce qu'elle soit tendre, puis étalée sur des plaques de verre. Chaque plaque de verre recouverte de matière grasse est appelée un châssis. Les fleurs fraîches sont placées rapprochées sur le châssis. Les fleurs sont renouvelées régulièrement (toutes les 24 heures pour le jasmin ou toutes les 72 heures pour la tubéreuse) (figure 14). Toutefois, l'opération peut durer environ un mois. Le mélange huile / graisse résultant est appelé une pommade. La pommade est mélangée avec de l'alcool pour enlever la graisse, et l'extrait restant est appelé une absolue. Cependant, 99% de jasmin et d'extrait de tubéreuse est maintenant produit par extraction par solvant.

L'enfleurage a l'avantage d'être réalisé à de faibles températures, généralement la température ambiante et d'éviter l'utilisation des solvants. Néanmoins, il a l'inconvénient d'avoir besoin d'un temps très long et beaucoup de main d'œuvre (Buckle, 1997).

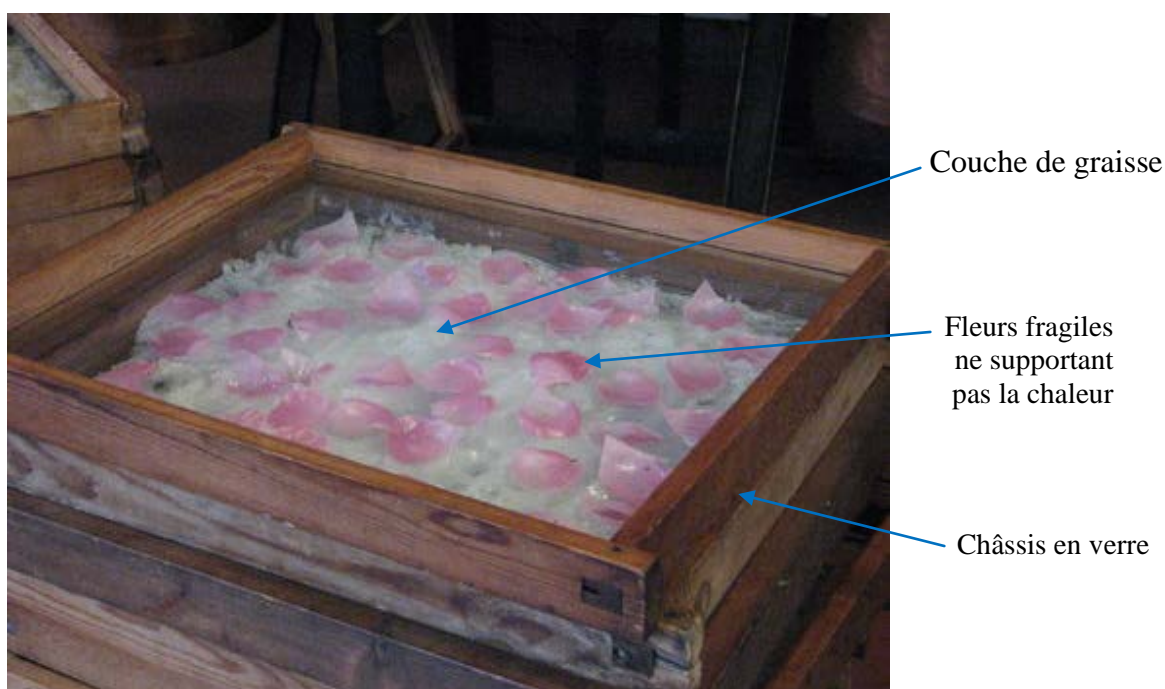


Fig. 14 – Technique d'enfleurage
(<http://diodor.e-monsite.com/pages/differentes-methodes-de-fabrication.html>)

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

II.6. Macération (extraction par la graisse chaude)

L'enfleurage à chaud ou macération est une technique utilisant la haute solubilité des huiles essentielles dans les corps gras. Il consiste à extraire au moyen de corps gras, préalablement bien épurés, les huiles essentielles de certaines plantes. La partie de la plante en question est plongée dans le solvant chauffé à environ 60 °C pendant un certain temps (24 à 48 heures). Le dissolvant (corps gras) se charge progressivement de la matière odorante. Le mélange est ensuite malaxé à de l'alcool à 96° qui lui enlève une partie du parfum en donnant une infusion. Par une distillation lente du solvant (alcool), on concentre ensuite le produit odorant. La bonne marche des opérations sans risques majeurs, fait appel à des aptitudes fondées de l'opérateur en matière de génie chimique. Malgré les bonnes performances techniques, ce procédé ne pourrait être donc recommandé pour une exploitation à petite échelle.

II.7. Extraction par des solvants

L'extraction par les solvants a été pratiquée pour la première sur les fleurs par le chimiste et pharmacien français Pierre Jean Robiquet en 1835 et est rapidement devenue une technique populaire. L'extraction pourrait avoir lieu à la température ambiante. Cependant, ceci est un processus complexe qui nécessite un appareillage coûteux. Cette méthode se pratique en trois étapes :

- 1^{ère} étape: Des solvants tels que le benzène, l'éther de pétrole, et, plus récemment, l'hexane ont été utilisés pour extraire les parties volatiles des plantes. Cette première étape conduit à un mélange de cire appelé concrète (huile essentielle 50% et cire 50%). L'hexane a été considéré comme solvant sûr et utilisé dans plusieurs processus d'extraction alimentaire. Cependant, il est impossible d'enlever tout le solvant après l'extraction.
- 2^{ème} étape: un solvant, habituellement l'éthanol, est utilisé pour dissoudre la cire. Cette étape est répétée plusieurs fois.
- 3^{ème} étape: Le mélange alcool / cire est évaporé sous vide.

L'extraction par les solvants offre la possibilité d'obtenir un produit constant, mais son inconvénient majeur demeure dans l'impossibilité d'enlever les solvants résiduels.

II.8. Extraction par les fluides supercritiques (CO₂)

L'extraction par le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique est une méthode innovante en utilisant du CO₂ "fluidisé", est disponible depuis les années 1980 et a fait des percées importantes dans les mondes des saveurs, parfums et aromathérapie. C'est une méthode qui ne nécessite pas de chaleur ou des solvants chimiques. Lorsque la température du CO₂ est maintenue à environ 31 ° C, sous pression, il agit comme un fluide et dissout la partie soluble de la plante dans le CO₂ (figure 15). Par conséquent, le rendement de l'extraction le CO₂ supercritique est beaucoup plus supérieur par rapport aux autres techniques d'extraction, mais l'inconvénient réside dans le fait que cette méthode est plus coûteuse (Buckel, 1997).

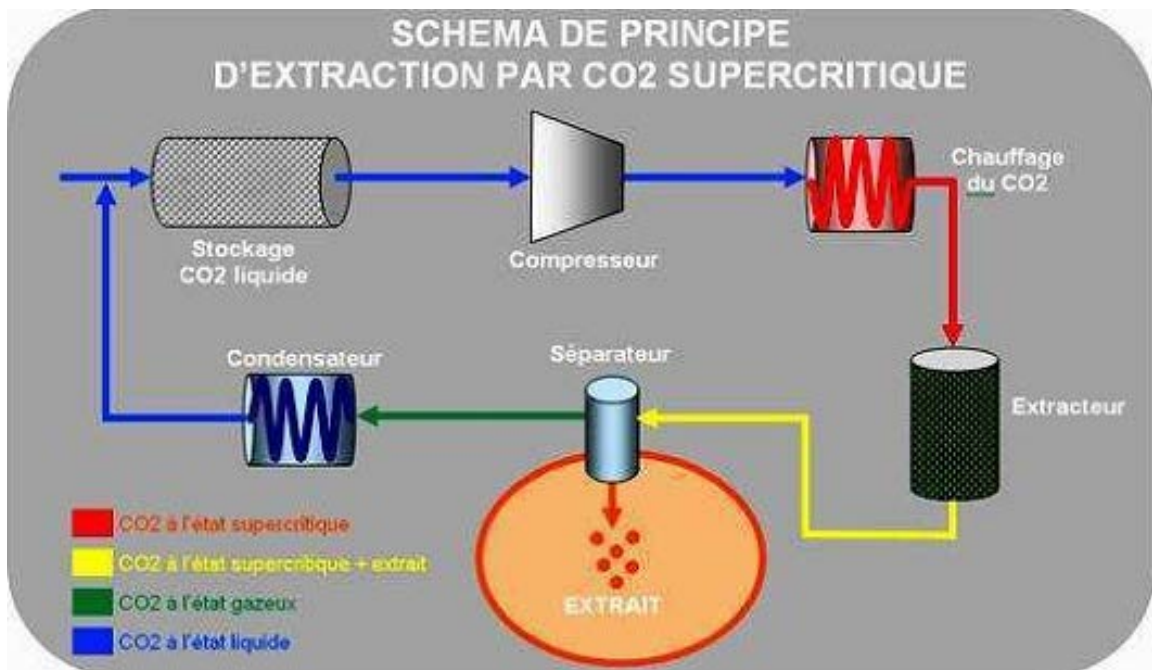


Fig. 15– Technique d'extraction par CO₂ supercritique (Duval, 2012)

III. TECHNIQUES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

III.1. Analyse par les couplages conventionnels

III.1.1. Introduction

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles, en vue de leur commercialisation, leur contrôle ou de leur valorisation, nécessite des analyses par des techniques de pointe telles que la chromatographie, la spectrométrie et la résonance magnétique nucléaire. Cependant, l'analyse peut s'effectuer avec une seule technique, mais quand il s'agit de mélanges complexes ou de constituants très proches, dont la séparation et l'identification sont difficiles, on procède au couplage de deux techniques ou plus.

III.1.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG /FID)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou rendus gazeux par chauffage sans décomposition. C'est la technique très utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs à ionisation de flamme (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles (figure 16). Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention). Les temps de rétention, bien que spécifiques pour chaque composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes. Les indices de rétention polaire ($I_r p$) et apolaire ($I_r a$) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou répertoriés dans la littérature. Cependant, une reproductibilité parfaite des indices de rétention est difficile à obtenir et ne peut être observée que sur des chromatogrammes réalisés sur une période courte avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Par ailleurs, le développement des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

et l'identification des composés dans les huiles essentielles. Ainsi, la CPG bidimensionnelle (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant co-éluer avec des composés plus abondants. L'échantillon est injecté dans une pré-colonne, puis les composés qui coéluent sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés.

L'utilisation de colonnes chirales en CPG bidimensionnelle permet l'analyse énantiomérique des constituants d'un mélange complexe. Dans de nombreux cas, la détermination de la distribution énantiomérique est utilisée pour la détection d'adultérations dans les arômes (Duval, 2012).

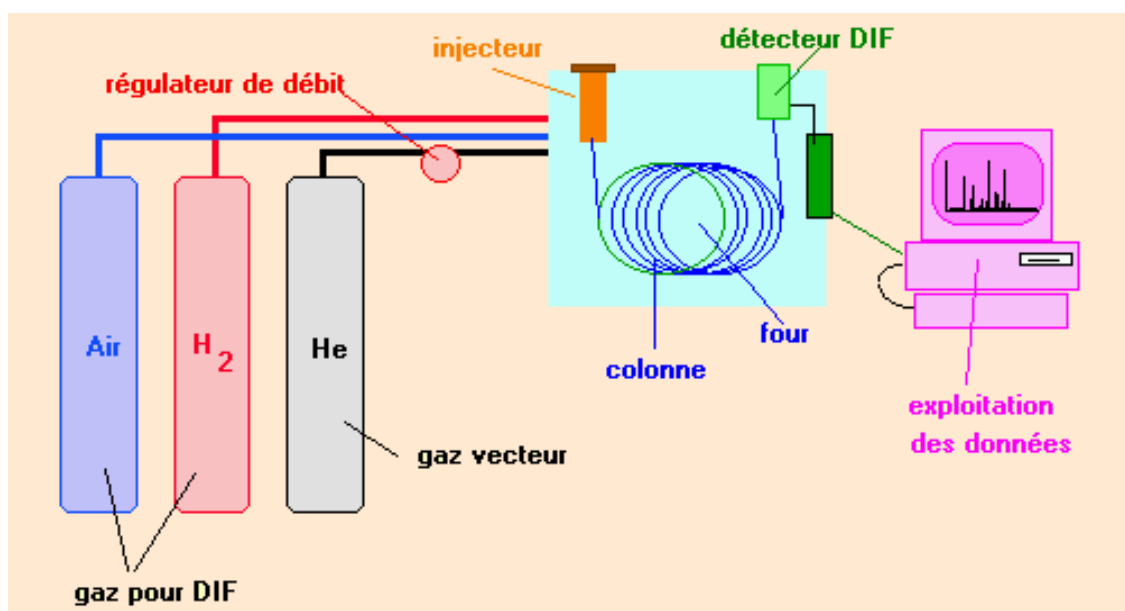


Fig. 16 – Schéma de la CPG/FID
(<http://cyber.collegeshawinigan.qc.ca/awilkin/chromatographie.htm>)

III.1.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Depuis son invention, cette technique n'a cessé

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

d'évoluer pour s'adapter aux analyses dans différents domaines, tels que l'agroalimentaire, l'industrie pétrolière et les produits naturels. Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux 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. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, les potentiels sont réglés de manière telle que seuls les ions d'une fourchette de masses déterminées traversent les barres. Par la suite, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Les détecteurs les plus courants sont les multiplicateurs d'électrons et les photomultiplicateurs ; ils convertissent les impacts ioniques en signaux. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs et dans certains cas des ions négatifs (figure 17) (Duval, 2012).

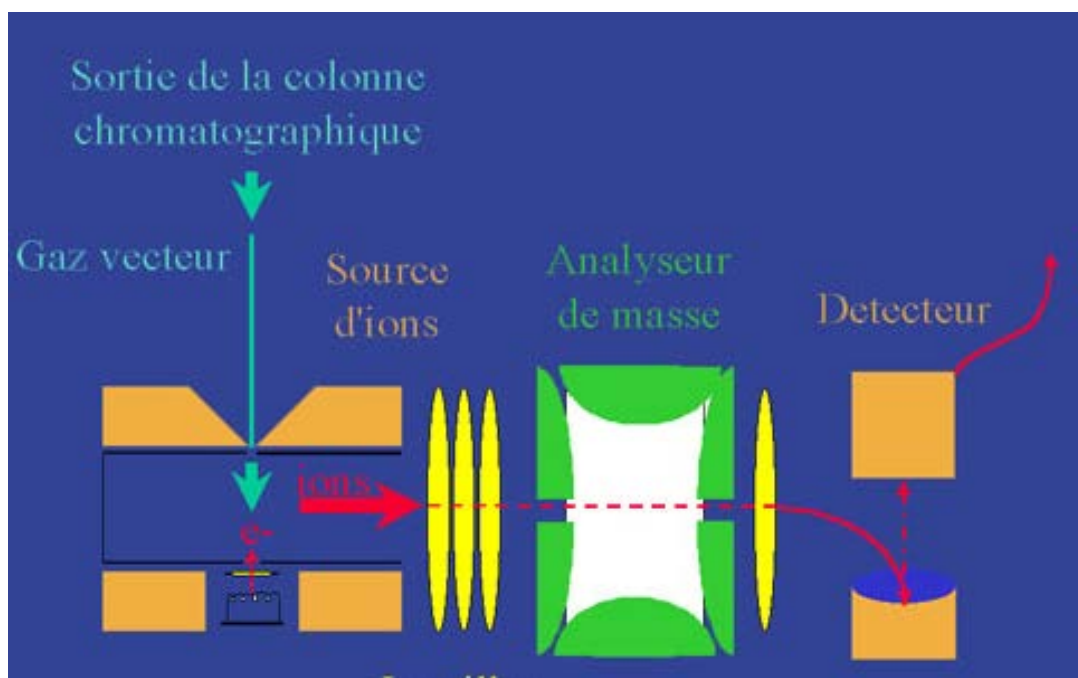


Fig. 17 – Schéma de la CPG couplée à la spectrométrie de masse (SM) (http://tpe-sciencepatrimoine.blogspot.com/2012/01/les-techniques-danalyse-analyses_1364.html).

Chapitre II **__***RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES*

III.1.4. Le couplage CPG/SM/SM

Les nombreuses difficultés rencontrées lors de l'analyse de mélanges complexes selon les différentes techniques et méthodes connues ont conduit, récemment, à la mise au point de la spectrométrie de masse multidimensionnelle à double analyseur (SM/SM) ou à triple analyseur. Cette technique, souvent couplée à la CPG, a connu un développement rapide ces dernières années. Le principe consiste à sélectionner un ion issu de la première fragmentation afin de le fragmenter de nouveau. Les fragments de l'ion secondaire constituent, alors le deuxième spectre de masse qui diffère selon l'origine de l'ion primaire. Souvent, le premier spectromètre de masse du couplage fonctionne en mode ionisation chimique et les suivants en mode impact électronique. Cette technique de couplage permettait de différencier les différents isomères d'un composé organique (Duval, 2012).

III.1.5. Autres techniques d'analyse des huiles essentielles

Les techniques de couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques (SM) ont permis une approche beaucoup plus précise de l'identification. Néanmoins, le développement d'appareils permettant d'atteindre des seuils de sensibilité comparables à ceux de la CPG/SM font du couplage CPG/IRFT (la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier) une technique de plus en plus intéressante dans l'analyse des arômes. Les couplages CPG/IRFT et CPG/SM sont donc deux techniques complémentaires adaptées à l'analyse des huiles essentielles. Il est aussi possible de coupler à la fois la CPG à un spectromètre de masse et à un détecteur infrarouge (CPG/IRFT/SM). Ces couplages permettent d'identifier plusieurs constituants présents à de faibles concentrations dans une huile essentielle. De plus, dans la CPG/SM, certaines molécules peuvent subir des transpositions sous l'effet de la température (réarrangement de Cope) et d'autres peuvent présenter des retards d'élution du fait d'une trop grande polarité ou d'une masse moléculaire trop importante. Le couplage CLHP (la Chromatographie Liquide Haute Performance) /SM a permis de surmonter ces difficultés en raison de la possibilité de travailler à température ambiante, d'une part, et d'utiliser des colonnes spécifiques à greffons « standards » ou « inverses », d'autre part. De plus, les améliorations apportées au niveau des interfaces d'ionisation à pression atmosphérique (API) permettent d'atteindre des sensibilités plus importantes. Le développement des techniques chromatographiques multidimensionnelles tels le couplage d'une chromatographie en phase

***Chapitre II* __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES**

liquide (CPL) avec une CPG (CPL-CPG) ou encore le couplage CPG-CPG, a permis de réaliser des progrès notables dans le domaine de la séparation des mélanges. Ainsi, les performances du couplage CPG/IRFT-SM ont été améliorées par l'utilisation de la CPG multidimensionnelle (CPGMD) à trois colonnes : une pré-colonne de polarité intermédiaire, une colonne polaire et une colonne apolaire (CPGMD/IRFT-SM) ; cela confère au système, en plus d'une double détection, une séparation optimale. D'autre part, le couplage en ligne CPL-CPG associe la sélectivité de la chromatographie en phase liquide avec la grande efficacité des colonnes capillaires. Des études récentes portant sur ces huiles essentielles ont aussi été réalisées à l'aide d'un couplage CLHP-CPG/SM qui a permis une identification encore plus performante. Il convient de signaler enfin, l'existence d'un couplage direct entre la CLHP et la RMN (résonance magnétique nucléaire) du proton (Duval, 2012).

III.2. Séparation des constituants préalablement à leur identification

Souvent, l'identification d'un grand nombre de constituants d'une huile essentielle nécessite un fractionnement préalable de cette huile essentielle par distillation fractionnée et/ou par une ou plusieurs techniques chromatographiques (CC, CCM, CLHP, CGP). Chaque fraction, constituant un mélange moins complexe, est soumise à l'analyse. Un grand nombre d'huiles essentielles, plus ou moins complexes, ont été étudiées selon cette voie depuis une quinzaine d'années. Les composés isolés ont ensuite été caractérisés par différentes techniques spectroscopiques : IR, SM, RMN du proton et du carbone-13 (Duval, 2012).

III.3. Analyse par RMN du carbone-13 sans séparation préalable

Une alternative aux méthodes d'analyse décrites précédemment est la RMN du carbone-13 des mélanges, sans séparation préalable des constituants. Cette technique, initié par Formáček et Kubeczka, développée par Casanova et coll. offre des potentialités fortement intéressantes. Le principe consiste à attribuer les raies de résonance de chacun des carbones de chaque composé à partir du spectre unique du mélange et de les comparer à des produits de référence répertoriés dans des bibliothèques. Contrairement aux techniques chromatographiques, les constituants ne font pas l'objet d'une individualisation en RMN. Différents aspects sont à considérer, à savoir l'observation et l'individualisation des différentes raies de résonance

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

dans le spectre du mélange et l'attribution de chacune de ces raies de résonance à un produit donné permettant son identification. L'individualisation de tous les signaux dans le spectre du mélange dépend de plusieurs paramètres :

- la complexité du mélange mais également le nombre de carbones constitutifs de chacun des constituants ;
- les différences entre les concentrations relatives des divers constituants ;
- les similitudes observées au niveau de tout ou partie des squelettes carbonés de molécules provoquant une augmentation du nombre de superpositions des carbones possédant des environnements magnétiques moyens identiques.

En regard de la technique de Formáček et Kubeckzka, l'originalité de la méthode développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » réside dans l'informatisation de la recherche qui est réalisée par un logiciel permettant de comparer le déplacement chimique de chaque carbone dans n'importe quel spectre expérimental avec ceux des atomes de carbone de composés purs répertoriés dans la bibliothèque de spectres élaborée au laboratoire de l'équipe à partir d'échantillons authentiques et/ou dans la bibliothèque construite à partir des données décrites dans la littérature. Ainsi, l'informatisation de la recherche permet, en un laps de temps très court, l'édition de toutes les informations nécessaires à la caractérisation des constituants d'un mélange complexe (attribution des raies de résonance, variation des déplacements chimiques, superpositions).

La certitude de l'identification des composés du mélange est rendue possible par la prise en compte des paramètres suivants :

- le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- le nombre de superpositions des signaux pouvant se produire quand les différents effets stériques et électroniques font que deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont le même déplacement chimique, ou quand des constituants du mélange ont une partie de leur squelette très proche ;

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

- les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ;
- l'intensité des raies de résonance observées qui permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à un composé donné.

L'apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'un mélange complexe est intéressant en ce sens qu'elle permet, dès lors que leur teneur est supérieure à 0,5% et qu'ils sont présents dans les bibliothèques de référence, d'identifier rapidement et sans ambiguïté, certains composés dont l'analyse par les techniques conventionnelles est problématique. D'une manière générale :

- tous les carbones sont observés à l'exception des carbones quaternaires de ceux des composés minoritaires ;
- les variations des déplacements chimiques sont inférieures ou égales à 0,05 ppm pour la grande majorité des carbones ;
- le nombre de superpositions est limité et n'empêche aucunement l'identification d'un composé par l'observation d'au moins 50% des carbones qui lui appartiennent en propre.

La RMN du carbone-13 des mélanges est efficace particulièrement pour la différenciation et l'identification de molécules structurellement très proches (stéréo-isomères). De même, les énantiomères de certains composés ont des spectres de masse identiques et des indices de rétention très proches ; seuls leurs spectres de RMN du carbone-13, très différents, permettent leur identification même si l'un seulement des isomères est présent dans l'huile essentielle. L'utilisation de cette technique est également intéressante pour l'identification des composés qui coéluent en CPG.

Enfin, la RMN du carbone-13 a été utilisée comme un outil dans l'identification de molécules thermosensibles. La RMN a permis également l'analyse d'autres molécules thermolabiles dans les extraits au CO₂ supercritique (Duval, 2012).

Chapitre II __RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

IV. Conclusion

Les huiles essentielles représentent une matière première exploitée dans divers secteurs : parfumerie, cosmétique, industries pharmaceutiques et agroalimentaire. Toutefois, les progrès en matière d'extraction et d'analyse des huiles essentielles ont beaucoup évolué dans le temps. Cependant, l'objectif d'une analyse peut être un simple contrôle de routine, comme il peut s'agir d'une analyse approfondie pour la recherche et la valorisation des huiles essentielles.

Parmi toute cette panoplie de techniques, nous nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, puisque c'est la méthode la plus simple et la plus utilisée d'une part, et d'autre part à y effectuer une analyse par CPG/SM, largement suffisante dans le cas de nos huiles.

PARTIE II

*PARTIE
EXPERIMENTALE*

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

cfCHAPITRE III: ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

I. Introduction

Actuellement, malgré les progrès en pharmacologie, l'usage des plantes à des fins thérapeutiques est omniprésent chez la majorité des peuples du monde entier. En Afrique, 80% de la population ont recourt aux plantes pour se soigner. En Algérie, et plus particulièrement au Sahara septentrional, on compte environ 500 espèces de plantes spontanées, dont une partie reste utilisée par la population comme plantes médicinales (Boualala et *al.*, 2014). Par ailleurs, la recherche ethnopharmacologique est considérée comme cruciale dans le développement et la découverte de nouveaux médicaments à partir de ressources naturelles (Jaradat, 2005). C'est dans cette optique que nous nous sommes fixé l'objectif de réaliser une enquête ethnopharmacologique des espèces étudiées auprès d'un échantillon d'individus de la région d'étude.

II. Moyens et méthodes

II.1. Description et choix des localités de l'enquête

Il s'agit d'une enquête ethnopharmacologique sur le genévrier de phénicie et le genévrier oxycèdre, réalisée durant l'année 2012 dans trois régions (Ain sefra, Djeniène bourezg et Béchar (figure 18)).

- **Ain sefra** est une commune de la wilaya de Naâma, se situant à l'ouest de l'Algérie avec une superficie de 1 023,13 km²; elle compte 54 229 habitants en 2008. La région est encore traversée par des populations nomades et semi-nomades qui vont, en été, pâturer sur les flancs des monts des Ksour (https://fr.wikipedia.org/wiki/Ain_Sefra, 2012).

- **Djeniène bourezg** est une commune de la wilaya de Naâma. Elle à 70 km au sud de Aïn sefra et couvre une superficie de 1 170,63 km² et compte en fin 2008 une population de 3 392 habitants (https://fr.wikipedia.org/wiki/Djeniène_Bourezg, 2012).

- **Béchar** est une commune de la wilaya de Béchar dont elle est le chef-lieu, située au sud-ouest du pays. Elle est à 254 km au sud d'Ain sefra et couvre une superficie de 5 050 km². Selon les statistiques de l'année 2008, sa population est estimée à 165 627 habitants (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Bechar>, 2012).

Il est bien établi que le climat est un facteur déterminant dans la répartition géographique des espèces animales et végétales. Ces deux wilayas (Naâma et Béchar) sont caractérisées par

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

un climat désertique sec et froid. Néanmoins, les relevés météorologiques des vingt dernières années de ces trois localités sont donnés au tableau 06. Par ailleurs, le choix de ces trois localités peut être justifié par le fait que ces dernières se trouvent dans la région de la présente étude (atlas saharien) d'une part, et d'autre part la disponibilité des plantes étudiées chez les herboristes, qui continuent à les vendre pour différents usages : encens et fumigation (*el-bkhour*), ingrédient pour préparer et conserver certaines denrées alimentaires traditionnelles (beurre (*smen*), dattes) ou pour des fins thérapeutiques.

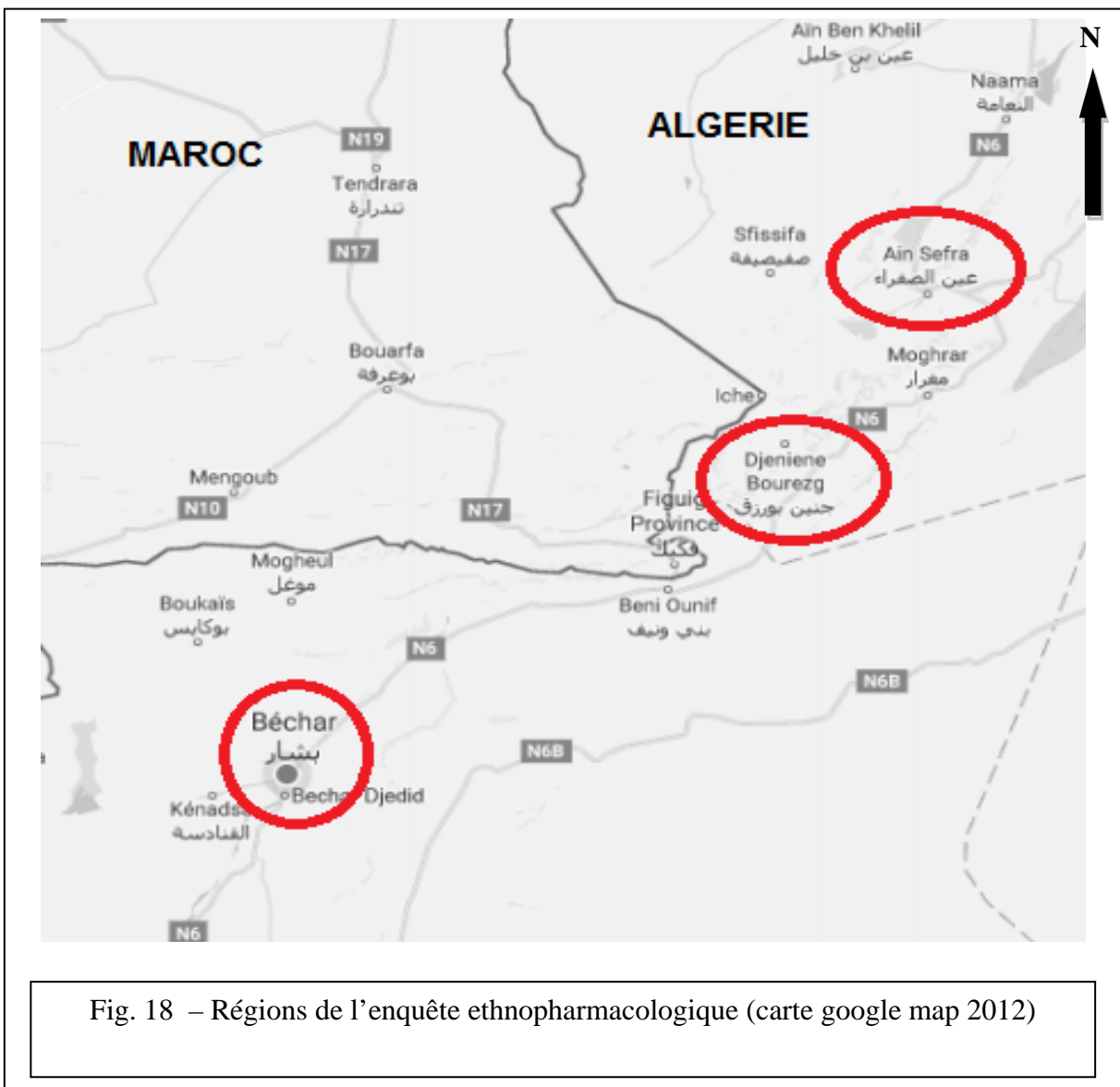


Fig. 18 – Régions de l'enquête ethnopharmacologique (carte google map 2012)

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

Tab. 06 – Données climatiques des localités de l'enquête

Paramètres climatiques	Station météorologique d'Ain Sefra et djenien bourezg ^{1,3} Indicatif : 60560	Station météorologique de Béchar ^{2,3} Indicatif : 60571
Température moyenne maximale (°C)	25.6	27.2
Température moyenne minimale (°C)	11.3	13.4
Température moyenne (°C)	19.8	20.3
Précipitations annuelles moyennes (mm)	205.93	82

1 : (<http://fr.tutiempo.net/climat/ws-605600.html> (dernière consultation 2015))

2 : (<http://www.climatedata.eu/climate.php?loc=agxx0028&lang=fr> (dernière consultation 2015))

3 : (<http://www.weatherbase.com> (dernière consultation 2015)).

II.2. Déroulement de l'enquête

L'enquête ethnopharmacologique a été réalisée durant l'année 2012 auprès d'une population hétérogène, composée de 150 individus issus des trois localités choisies et qui ont accepté de participer à cette enquête. On a procédé au préalable par une conversation avec les participants (herboristes, pasteurs et autres), en leur montrant des échantillons des deux espèces de genévrier, et ce pour savoir s'ils arrivent à les identifier d'une part ; et d'autre part à nous fournir tout ce qu'ils savent sur les utilisations de ces deux espèces, surtout à des fins thérapeutiques. Les informations collectées sont soit obtenues directement après chaque conversation ou recueillies par le biais d'une fiche d'enquête (modèle ci-dessous : pages 43-44). La dernière étape consiste à trier les données collectées, puis à en calculer le pourcentage de l'utilisation de chaque plante en phytothérapie.

Chapitre III *_ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES*

Fiche d'enquête ethnopharmacologique n° :

Date :

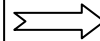
Localité :

Age :

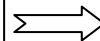
Niveau académique :

Activité (profession) :

1- Connaissez-vous ces deux plantes?



Plante (a)



Plante (b)

2- Quels sont leurs noms vernaculaires ?

a-

b-

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

3- Existent –t- elles dans la région :

4- Quelles parties sont utilisées en médecine traditionnelle? :

.....
.....
.....

5- Pouvez-vous citer quelques usages :

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

6- Pouvez-vous citer quelques modes de préparation :

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

III. Résultats et discussion

Les caractéristiques de la population d'enquête telles que : l'âge, l'effectif, la profession et le niveau d'instruction sont données au tableau (07).

Tab. 07 – Caractéristiques de la population d'enquête

Catégorie (profession)	Age (ans)	Effectif	Niveau académique	Région
Herboristes	30 - 70	23	Non scolarisés jusqu'au niveau secondaire	Ain sefra – Djeniene bourezg - Béchar
Pasteurs (Bergers)	30 - 60	10	Non scolarisés jusqu'au niveau secondaire	Ain sefra – Djeniene bourezg
Autres	30 - 76	117	Non scolarisés jusqu'au niveau universitaire	Ain sefra – Djeniene bourezg - Béchar

Par ailleurs, la tranche d'âge des individus, autres les herboristes et les pasteurs, a été choisie à partir de 30 ans et plus afin d'écarter la méconnaissance des modes et usages thérapeutiques du genévrier par les sujets plus jeunes. Les résultats de l'enquête ont montré que 80% de la population connaissent le genévrier de phénicie comme étant le vrai « arar », alors que peu de gens (30%) connaissent le genévrier oxycèdre. Ce dernier est surtout connu par les pasteurs et quelques herboristes de la région de Ain sefra et de Djeniene bourezg et le nomment « tagga ». On a remarqué aussi que le genévrier de phénicie est disponible chez la plupart des herboristes, par contre le genévrier oxycèdre est quasiment introuvable.

Par ailleurs, les utilisations de ces deux plantes par la population d'enquête en médecine traditionnelle sont rapportées dans le tableau (08). On a constaté qu'à l'inverse du genévrier oxycèdre, le genévrier de phénicie ou rouge est utilisé beaucoup plus en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Toutefois, les parties les plus utilisées du genévrier rouge sont les feuilles et les fruits rouges, soit pour la préparation de décoction ou pour préparer une poudre utilisée seule ou en mixture avec d'autres ingrédients (plantes médicinales, miel, ...). Le bois de cette plante est utilisé comme celui du genévrier oxycèdre pour la préparation du goudron végétal, appelé l'huile de cade ou « gatrane » pour soigner les affections dermiques ou lutter

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

contres certains parasites chez l'homme et l'animal. Cependant, certains pasteurs utilisent les cendres des feuilles et rameaux du genévrier oxycède pour soigner quelques affections ophtalmiques chez le bétail. En outre, nous avons constaté que les posologies et les quantités du matériel végétal utilisé dans les préparations à base de genévrier varient d'un utilisateur à un autre ; à titre d'exemples : la décoction de 25 baies rouges par tasse d'eau prise trois fois par jour est efficace contre les affections pulmonaires, gaz intestinaux et la toux ; ou à préparer une boisson à partir des feuilles de genévrier rouge à raison de 25g dans 180 ml d'eau bouillante et 15g de miel pour soigner les problèmes de la miction, calculs rénaux à une dose de 3 à 4 verres d'eau par jour. De surcroît, la consultation de certains ouvrages et sites internet nous laisse perplexes devant la multitude des modes de préparation et les posologies de cette plante, qui varient en fonction des espèces de genévrier d'une part, et des maux à traiter d'autre part.

Tab. (08) - Résultats de l'enquête ethnopharmacologique

plante	Partie utilisée	Mode de préparation	Utilisations (Pourcentage des réponses)
Genévrie de phénicie : <i>Juniperus phoenicea</i>	Feuilles et fruits	Infusion, décoction, poudre, cataplasme	Traiter les pneumonies (26%) et gastrites (73,33%), mauvaise haleine (6,66%), diurétique (33,33%), anti inflammatoire (16%), anti rhumatisme (8%), plaies et affections cutanées (12%)
	bois	Décoction	anti inflammatoire (16%), anti rhumatisme (8%)
		pyrolyse	Soigner les affections de la peau et combattre les maladies parasitaires (60%)
Genévrier oxycède : <i>Juniperus oxycedrus</i>	Feuilles et bois	pyrolyse	Soigner les affections de la peau (eczéma, psoriasis, vitiligo) et combattre les maladies parasitaires (poux, lentes, gales, tiques, etc. (60%)

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

Les espèces de *Juniperus* (Cupressaceae) sont généralement utilisées dans la médecine alternative pour le traitement de différentes maladies: les rhumatismes, les maladies inflammatoires, la bronchite, l'urticaire, la dysenterie, des saignements, la gale, les champignons, hémorroïdes, etc. Par ailleurs, les résultats de notre enquête sont globalement en accord avec les données de la littérature.

En effet, l'usage du genévrier à des fins médicinales a été rapporté dans plusieurs enquêtes ethnobotaniques. Kahouadji (1995), rapporte que les feuilles de *J. oxycedrus* en décoction, associées avec celles de *Phillyrea latifolia* L. et *Calycotome villosa*, représentent un bon remède contre l'ictère. Par ailleurs, le genévrier commun et de phénicie sont conseillés dans la prévention et le traitement de nombreuses affections, entre autres : diabète de type 2, anti-diarrhéique, maladies de la peau (eczéma), anti-colique, anti-psoriasis, carminatifs, antiseptiques, diurétique, tonique et anti-inflammatoire, etc. (Jouad et *al.*, 2001 ; Jaradat, 2005 ; Hamza, 2011 ; Richard, 2012 ; Ait Ouakrouch, 2015). Cependant, le mode d'administration de ces remèdes varie en fonction des affections et des pathologies à traiter. Derwich et *al.* (2010) rapporte que l'huile essentielle de *J. phoenicea* a été utilisée pendant des siècles comme un inhalateur de vapeur pour traiter la bronchite et de contrôler l'arthrite. Récemment, El youbi et *al.* (2016) rapportent que la poudre des feuilles de *J. oxycedrus* L. est recommandée en tant que cataplasme pour soigner l'eczéma ; tandis que la prise par voie orale de thé et de poudre des feuilles et des baies de *J. phoenicea* L. respectivement, est efficace contre l'asthme, l'hépatite et le rhumatisme. A l'inverse du goudron végétal extrait par pyrolyse, l'huile essentielle du genévrier est peu connue chez la population d'étude, et ce sont les individus ayant un niveau académique supérieur ou quelques herboristes qui savent qu'on peut extraire du genévrier de l'huile essentielle. Toutefois, nous avons constaté que l'huile essentielle vendue par certains herboristes est moins demandée car la plupart des gens la trouve peu efficace voire inefficace et qu'il s'agit d'un mélange empirique d'une huile fixe et d'huile essentielle, sans indication des proportions, pour usage externe ; tel que le massage, pour la plupart de ces huiles. Cependant, le manque de connaissances sur le potentiel toxique de ces plantes limite leur application en toute sécurité.

Il est vraisemblable que la présente enquête ethnopharmacologique ne nous permette pas à elle seule d'affirmer ou de confirmer la toxicité des espèces étudiées. Dès lors, nous avons procédé à une lecture comparative des résultats d'autres enquêtes et travaux scientifiques afin de mettre en évidence la toxicité éventuelle des genévriers. En effet, DerMarderosian & Beutler (2004) ont constaté que les genévriers ont des effets allergiques indésirables chez

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

l'espèce humaine. Ceux-ci comprennent l'allergie professionnelle affectant la peau et des voies respiratoires par une sensibilité au pollen de genévrier.

Dans d'autres rapports, ces mêmes auteurs notent que les chinois, les japonais et les philippins ont tendance à être plus sensibles aux pollens de genièvre que les caucasiens, et que le contact externe (la peau) aux préparations à base de genévrier cède pour traiter le psoriasis peut causer des dommages de l'ADN des tissus humains d'une part. D'autre part, le 1-terpinène-4-ol de l'huile essentielle de genévrier a un effet irritant du rein. De plus, l'huile peut provoquer une irritation gastrique et peut provoquer la diarrhée. Par conséquent, son utilisation est limitée à de faibles concentrations (moins de 0,01%). Ils rapportent aussi que l'administration orale de genévrier oxycèdre à une dose de 8014 mg / kg est létale pour le rat.

D'autres études ont montré que différents extraits de *J. oxycedrus* L. ont une faible toxicité aiguë. La dose létale 50 (DL50) cutanée de l'huile essentielle des baies chez le lapin a été supérieure à 5 g / kg. Ces études ont montré aussi que l'emploi de plusieurs extraits des espèces de genévrier utilisés dans les parfums et les additifs biologiques ou dans des formulations cosmétiques variées, avait peu de toxicité sur les animaux. Cependant, il y avait des effets de sensibilisation au goudron (Morrie et al., 2004).

Enfin, Perry (2013) a constaté que *J. communis* a des effets indésirables tels que : allergénique, augmentation du tonus utérin, des effets abortifs et emménagogue. De même, *J. sabina* a des effets abortifs.

IV. Conclusion

L'enquête ethnopharmacologique n'est qu'une partie de l'étude ethnobotanique, qui permet d'avoir une idée sur les différentes utilisations des plantes à des fins thérapeutiques. Néanmoins, cette enquête nous a beaucoup aidé dans le choix d'une plante relictuelle des piémonts ouest et sud ouest de l'atlas saharien, qui est le genévrier (*J. phoenicea* et *J. oxycedrus*). Cependant, c'est le genévrier rouge qui est le plus abondant et le plus utilisé dans la médecine traditionnelle dans la région d'étude. En effet, nous avons constaté que ce sont bien les herboristes, les pasteurs ainsi que les personnes les plus âgées qui ont une assez bonne connaissance de cette plante. Auparavant, cette plante connaissait des utilisations très diversifiées dans plusieurs domaines, mais dont l'usage actuel en médecine traditionnelle reste limité (traitement des gastrites) et devient l'apanage des personnes démunies ou qui croient encore aux vertus médicinales ou magiques de cette plante.

Chapitre III _ETUDE ETHNOPHARMACOLOGIQUE DES ESPECES ETUDIEES

Enfin, il est certain que les données pharmacologiques et toxicologiques expérimentales seront importantes dans une approche thérapeutique, mais l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* à des conditions *in vivo* reste difficile, en raison du manque de données sur la toxicité de cette plante chez l'espèce humaine.

CHAPITRE IV : CARACTERISATION CHIMIQUE DES PLANTES ETUDIEES

I. INTRODUCTION

La composition en métabolites secondaires varie d'une espèce végétale à une autre voire même au sein d'une même espèce sous l'influence de divers facteurs génétiques et abiotiques (édaphiques, climatiques, etc.). Cependant, la sélection du genévrier dans la partie sud ouest de l'atlas saharien, à proximité de la frontière algéro-marocaine, se justifie par le manque voire la quasi absence d'études de la composition chimique des huiles essentielles de cette plante. C'est dans ce contexte que nous aborderons dans ce chapitre le dosage de quelques métaux lourds, le criblage phytochimique, l'extraction et l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des espèces sélectionnées.

II. MATERIEL VEGETAL

Dans un premier temps, les feuilles et les baies de *J. phoenicea* ont été récoltées dans l'atlas saharien (Site 1 : Jebel Morghad à Ain sefra dans la wilaya de Naâma, au sud ouest de l'Algérie) au mois de mars 2011, à une altitude de 1480 m. Dans un second temps, des feuilles et baies de *J. phoenicea* et des feuilles de *J. oxycedrus* (pied mâle) ont été récoltées en mois de décembre 2012 à environ 50 km au sud du premier site dans la région de Founassa (Site 2), aux coordonnées de 32°30'43.047" N de latitude, 0°50'9.669" O de longitude à une altitude de 1612 m et 32°32'43.047" N de latitude et à 0°51'9.669" O de longitude à une altitude de 1269 m respectivement (figure 19).



Fig. 19 - Carte géographique de la région d'étude (photo Google Earth 2013).

III. DOSAGE DES METAUX LOURDS

Le dosage de quelques métaux lourds au niveau des feuilles et baies des espèces sélectionnées est réalisé en utilisant un spectromètre d'absorption atomique (SAA) (Perkin- Elmer SAA300). Les étalons et les échantillons à analyser sont préparés selon le protocole du manuel : Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy, édité en 1996 par la société Perkin-Elmer.

III.1. Incinération

La minéralisation par voie sèche peut être utilisée pour la préparation des échantillons pour la détermination des métaux présents dans le matériel végétal étudié.

- 1- 20 à 30 mg de poudre végétale sont introduits dans un creuset en porcelaine;
- 2- le creuset est placé dans un four à moufle à une température de 300°C, puis on augmente la température jusqu'à 400 à 500°C pendant 2 à 4H, pour obtenir des cendres blanches friables;
- 3- après le refroidissement du creuset on ajoute 1 à 2 ml d'acide nitrique (HNO₃) (1N);
- 4- après évaporation sur une plaque chauffante ou au bain de sable, on replace le creuset au four à 400°C/ pendant 1H.

III.2. Préparation des différentes solutions par attaque acide

Trois solutions (solution d'acide nitrique concentré, solution d'acide chlorhydrique concentré, l'eau régale) peuvent être utilisées pour extraire la totalité des métaux lourds dans la matière végétale calcinée. Néanmoins, nous avons procédé à l'attaque par l'acide chlorhydrique.

a- Mise en solution des métaux par l'acide chlorhydrique (HCl)

- on introduit 0.5g de cendres dans un erlenmeyer et on ajoute 5ml de HCl concentré (35%).
- on chauffe l'erlenmeyer à une température de 40 - 60°C pendant 8h sous agitation;
- après refroidissement, on filtre avec rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25ml.

III.3. Dosage des solutions

Le dosage des métaux lourds repose sur la disponibilité des lampes cathodiques spéciales pour les métaux à doser. Cependant, nous n'avons la possibilité de doser que quelques métaux lourds (Cu, Fe, Pb, Zn) par spectromètre d'absorption atomique (SAA PerkinElmer 300). En parallèle, des solutions étalons, pour chaque métal, sont préparées à différentes concentrations en (ppm) puis dosées. Le blanc (contrôle) contient tous les réactifs excepté l'échantillon à doser (le test).

III.4. Calcul de la teneur en métaux

La teneur des métaux lourds (mg) dans la matière végétale sèche (kg), est calculée par la formule suivante:

$$T \text{ (ppm)} = X * V / M * D$$

X : Concentration en ppm (mg/l) mesurée par le spectromètre ;

V : Volume final en ml de la solution d'attaque;

M : Masse en g de la prise d'essai;

D : Facteur de dilution.

III.5. Résultats et discussion

III.5.1. Teneur en cendres

La minéralisation par calcination nous a permis de déterminer la teneur en cendres (%) dans la matière sèche (MS) des trois espèces étudiées (tableau 09).

Tab. 09 - Taux des cendres des feuilles et baies de *J. phænicea* et *J. oxycedrus*

Echantillon	Taux en cendres (% MS)		
	<i>J. phænicea</i> Site 1	<i>J. phænicea</i> Site 2	<i>J. oxycedrus</i> Site 2
Feuilles	5,64	5,68	5,74
Baies	2,50	2,54	-

On constate qu'il n'y a pas grandes différences dans les taux de cendre entre les espèces étudiées. Cependant, le taux de cendres des feuilles est supérieur à celui des baies ; il est presque le double par rapport aux baies. Néanmoins, Achak (2006) a obtenu un taux de 4,83 % au niveau des feuilles. Ce résultat montre bien que les feuilles de *Juniperus phænicea* de l'atlas saharien de l'Algérie sont plus au moins riches en matière minérale que les feuilles de *Juniperus phænicea* des montagnes de l'Atlas, Marrakech (Maroc). Par contre, les feuilles de *Juniperus oxycedrus* du Maroc sont plus riches en matière minérale que celui de l'Algérie. En effet, Achak (2006) a obtenu un taux de 9,25 % au niveau des feuilles.

III.5.2. Teneur en métaux

Les résultats du dosage de quelques métaux en ppm (partie par million) dans la matière sèche (MS) des trois espèces étudiées sont regroupés dans le tableau 10.

Tab. 10 - Teneur en métaux des feuilles, baies et des rameaux de *J. phœnicea* et *J. oxycedrus*

Echantillon	Taux en métaux (ppm)											
	<i>J. phœnicea</i> Site 1				<i>J. phœnicea</i> Site 2				<i>J. oxycedrus</i> Site 2			
	Fe	Pb	Zn	Cu	Fe	Pb	Zn	Cu	Fe	Pb	Zn	Cu
Feuilles	13,02	1,18	0,38	0,95	13,12	1,21	0,41	0,98	16,10	1,31	0,35	0,87
Baies	20,18	0,84	1,18	0,92	20,21	0,87	1,17	0,96	-	-	-	-

On remarque que les feuilles et les baies de *J. phœnicea* de l'atlas saharien sont riches en fer. Toutefois, la teneur en zinc est presque la même dans les feuilles et les baies des deux espèces de *J. phœnicea* des deux sites 1 et 2, ainsi que dans les feuilles de *J. oxycedrus*. Néanmoins, ces teneurs en zinc restent les plus faibles par rapport aux autres métaux. Les teneurs des feuilles de *J. phœnicea* en métaux comparés aux résultats obtenus par Achak (2006): fer (19 ppm), plomb (1 ppm), cuivre (4 ppm), zinc (4 ppm) montrent que nos échantillons sont moins riches en métaux dosés. Par contre, les feuilles de *J. oxycedrus* de notre échantillon ont une teneur en fer (16,1 ppm) supérieure à celle des feuilles de *J. oxycedrus* (7 ppm) des montagnes du grand atlas au Maroc (Achak, 2006).

IV. CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Le criblage phytochimique consiste à réaliser des tests présomptifs de métabolites secondaires dans un matériel végétal.

IV.1. Matériel et méthodes

Il existe plusieurs variantes des tests dédiés au criblage phytochimique. Cependant, on a procédé avec les protocoles expérimentaux réalisés sur le genre *Juniperus* dans les travaux de Achak (2006). Par ailleurs, le témoin dans chaque test doit contenir tous les réactifs excepté le test.

Chapitre IV _____ **CARACTERISATION CHIMIQUE DES PLANTES ETUDIEES**

IV.1.1. Les flavonoïdes

4g de matériel végétal broyé sont extraits par 20ml de méthanol pendant 15min. A 1ml de cet extrait filtré, on ajoute 5ml d'alcool à 50% et 1 ml de l'acide chlorhydrique concentré et 2 à 3 copeaux de magnésium. La réaction est positive lorsqu'une couleur rouge apparaît au bout de quelques minutes (Paris et Nothis, 1969).

IV.1.2. Les alcaloïdes

10g de matériel végétal broyé sont agités dans 50ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 0,1N) pendant 15min. la solution obtenue après filtration est alcalisée par 5ml d'une solution d'ammoniaque à 25% puis diluée par 50ml d'eau distillée. L'extraction des alcaloïdes se fait avec 50ml de dichlorométhane. Le résidu obtenu après évaporation sous vide est additionné de 2ml d' H_2SO_4 (0,5N) et quelques gouttes du réactif de Dragendorff. La présence des alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité rouge orangé (Paris et Nothis, 1969).

IV.1.3. Les tanins

L'addition au décocté du matériel végétal à 50% d'une goutte d'une solution aqueuse de chlorure ferrique ($FeCl_3$ 2%) donne en présence des tanins une coloration bleu foncée ou vert foncée (Mazliak, 1974).

IV.1.4. Les quinones

On réalise une extraction en milieu acide par le chloroforme : on ajoute 20ml de chloroforme au matériel végétal broyé (2g) et humecté avec 2ml d'acide chlorhydrique (0,1N). Après filtration au bout de quelques heures de contact, la liqueur organique est agitée avec 5ml d'ammoniaque diluée au 1/2 à partir d'une solution à 25%. Une coloration rose, rouge ou violacée se développe si la réaction est positive (Bouquet, 1962).

IV.1.5. Les terpènes et stérols

4g de matériel végétal broyé sont extraits par 20ml de méthanol pendant 15min. Après filtration et évaporation, 1mg de l'extrait alcoolique est solubilisé dans quelques gouttes d'acide acétique additionné de 3ml du mélange (anhydride d'acide acétique – acide sulfurique concentré 50/1). L'apparition d'une coloration verte indique la présence de ces composés (Bouquet, 1962).

Chapitre IV _____ CARACTERISATION CHIMIQUE DES PLANTES ETUDIEES

IV.1.6. Les saponines (saponosides)

On prépare le décocté du matériel végétal à 20% et après la filtration on agite pendant une minute. La réaction est positive lorsqu'on note la formation d'une mousse stable de 1 à 10cm pendant au moins 10min (Pharmacopée Française (8^{ème} édition), 1965).

IV.1.7. Les anthraquinones

A l'extrait chloroformique de chaque échantillon, on ajoute du KOH aqueux 10% (v/v). Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge (Mazliak, 1974).

IV.1.8. Les anthocyanes

L'infusé du matériel végétal à 10% est additionné d'acide chlorhydrique concentré. La réaction est considérée comme positive en présence d'une coloration rouge (Mazliak, 1974).

IV.2. Résultats et discussion

Les résultats du criblage phytochimique des trois espèces sélectionnées sont donnés au tableau 11.

Tab. 11 – Résultats du criblage phytochimique

Métabolites	<i>J. phænicea</i> S1 et S2		<i>J. oxycedrus</i>
	Feuilles	Baies	Feuilles
Flavonoïdes	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	-
Tanins	+	+	+
Quinones	-	-	-
Terpènes et stérols	+	+	+
Saponosides	+	+	+
Anthraquinones	-	-	-
anthocyanes	-	-	-

+ : Présence. - : Absence.

Le criblage phytochimique est une étape primordiale dans la recherche de drogues végétale. Cependant, l'analyse de nos échantillons révèle en effet la présence de la plupart des classes de métabolites secondaires. Toutefois, on remarque que seules les feuilles de *J. oxycedrus* ont donné

un résultat négatif. Ceci peut être dû à l'absence de ces métabolites ou à la faible teneur de cette espèce en alcaloïdes. Par ailleurs, ces résultats sont relativement en accord avec ceux obtenus par (Achak, 2006) et (Mazari, 2009).

V. EXTRACTION ET ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

V.1. Matériel et méthodes

V.1.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau du matériel végétal a été déterminée par le procédé de séchage dans une étuve à 103 °C +/- 2 °C jusqu'à obtention d'un poids constant (Satrani *et al.*, 2007). Elle est calculée par la formule suivante:

$$T\% = (\text{poids } \alpha - \text{poids } \beta) / \text{poids } \alpha \times 100.$$

α : poids de l'échantillon (feuilles ou baies fraîches).

β : poids du l'échantillon (feuilles ou baies sèches).

V.1.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des feuilles et des baies des espèces de *J. phænicea* et *J. oxycedrus* a été effectuée par hydrodistillation (HD). Dans chaque essai, 200 g de matériel végétal ont été soumis à l'hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger pendant 3 heures. L'huile essentielle obtenue a été conservée à +4° C jusqu'à son utilisation (Dob *et al.*, 2006) (figure 20).

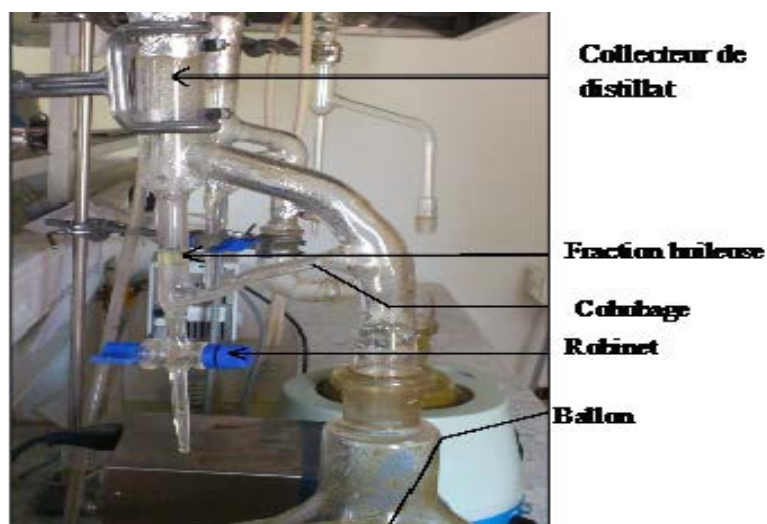


Fig. 20 - Montage de l'hydrodistillation

V.1.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle et le poids de la partie de la plante à traiter. Le rendement exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante (Carré, 1953) :

$$R = (P_B / P_A) \times 100$$

P_B : Poids de l'huile en g.

P_A : Poids des feuilles ou baies sèches en g.

R : Rendement de l'huile essentielle en pourcentage.

V.1.4. Caractérisation physicochimique

Des techniques conformes aux normes AFNOR (1992) ont été suivies pour déterminer la densité relative à 20 °C, le pouvoir rotatoire à l'aide d'un polarimètre et l'indice de réfraction par un réfractomètre à 20 °C. Cependant, l'indice de réfraction est calculé par la formule suivante :

$$n_{20} = n_t + 0,00045 (t - 20^\circ\text{C}) \text{ avec :}$$

n_{20} : indice de réfraction à 20°C;

n_t : indice de réfraction lu à la température ambiante;

t : température de mesure.

V.1.5. Composition chimique

L'analyse et l'identification des constituants des huiles essentielles ont été réalisées par les techniques chromatographiques. La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse nous a permis, à l'aide des banques de données spectrales (par comparaison des spectres de masse de chaque constituant) de déterminer les composés. Par contre la chromatographie munie d'un détecteur à ionisation de flamme permet la quantification.

V.1.5.1. La chromatographie en phase gazeuse - détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF) couplée à la spectrométrie de masse (SM)

Les analyses CPG-DIF et CPG-SM sont effectuées simultanément sur un Thermo Fisher Scientific Trace CG Ultra utilisant un diviseur SM-DIF en quartz, une colonne de réduction en silice fondue (20 cm x 0,1 mm) à l'interface CG-SM et une colonne de silice fondue désactivée qui sert de ligne de transfert au détecteur DIF. L'injecteur split/splitless est chauffé à 230 °C et connecté à une colonne capillaire SE-52 (50 m x 0,25 mm x 1,0 µm). Le détecteur DIF fonctionne à 250 °C. Le volume de l'échantillon (huile essentielle) injecté est de 0.1 µl à l'aide

d'une seringue à aiguille de 0,5 µl avec un rapport de division de 1:100 en utilisant un échantillonneur automatique (TriPlus RSH Autosampler). L'identification des substances est assurée avec un spectromètre de masse type Thermo Fisher Scientific ISQ avec un chauffage de l'interface CG-SM à 250 °C, source d'ions 230 °C, mode Impact Electronique (IE) à 70 eV, filament 50 µA, plage de balayage 40 – 60 uma. La température de la colonne est programmée comme suit : 60°C pendant 1 min jusqu'à 230°C à raison de 3°C/min, puis 230°C pendant 12,3 min. Le gaz vecteur est l'hélium 5,0 réglé à un débit constant de 1,5 ml / min.

V.1.5.2. Identification des composés

L'identification des composés est faite à l'aide du logiciel Thermo Xcalibur 2.2 en corrélant les spectres de masse obtenus aux bases de données NIST 08 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland), Wiley Registry of Mass Spectral Data 8^e édition (Wiley, Hoboken, New Jersey) (Adams, 2001), terpenoides MassFinder library (Hochmuth, Hambourg, Allemagne). Les indices de rétention sont déterminés selon (Van Den Dool et Kratz, 1963 ; National Institute of Standards and Technology, 2013). La quantification est réalisée par le calcul des aires en dessous des pics normalisés du chromatogramme.

V.2. Résultats et discussion

V.2.1. Teneur en eau

La teneur en eau des feuilles de *J. phoenicea* des site1 et site2 sont de 41,9 % et 46 % respectivement. Cependant, les baies renferment plus d'eau que les feuilles, avec des teneurs qui varient de 43 à 48 % dans les deux échantillons respectivement. Ces valeurs montrent que les feuilles du genévrier de phénicie de l'atlas saharien contiennent plus d'eau que celui du Maroc (32%) (Achak, 2006). Toutefois, la teneur en eau des feuilles de *J. oxycedrus* est de 31,53%, elle aussi supérieure à celle des feuilles de genévrier oxycèdre du Maroc (25.83%) (Achak, 2006).

Par ailleurs, on peut justifier ces variations de la teneur en eau par l'impact de plusieurs facteurs, notamment, les conditions physiologiques et environnementales (les conditions climatiques), ainsi que la répartition géographique (Hopkins et *al.*, 2003).

V.2.2. Rendement de l'hydrodistillation

Les rendements d'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles obtenus sont donnés au tableau 12.

Tab. 12 – Rendements (%) en huiles essentielles des espèces étudiées

Espèce	Feuilles fraîches	Feuilles sèches	Fruits secs
<i>J. phoenicea</i> (site 1)	0,6	0,9	2,0
<i>J. phoenicea</i> (site 2)	-	0,68	2,5
<i>J. oxycedrus</i> (site 2)	-	0,1	-

On constate que les rendements de l'hydrodistillation des baies (site1: 2 % et site2: 2,5 %) représentent le double de ceux obtenus avec les feuilles sèches de *J. phoenicea* des deux sites (site1: 0,6% et site2: 0,9 %), alors qu'ils sont très faibles pour les feuilles sèches de *J. oxycedrus* (0,1 %). Les rendements obtenus avec le même procédé d'extraction à partir des feuilles sèches de *J. phoenicea* de la région de Marrakech (Maroc) sont en partie similaires à nos résultats (0,9 %) (Bahri et al., 2011). Cependant, nos rendements sont supérieurs à ceux obtenus par (Cavaleiro et al., 2006; Bouzouita, 2008 et Mansouri et al., 2010).

En ce qui concerne les feuilles sèches de *J. oxycedrus* pied mâle, le rendement en huile essentielle est de 0,1%. Cette valeur a été obtenue par plusieurs auteurs (Dob et al., 2006 ; Mansouri et al., 2010). Néanmoins, le rendement en huile essentielle des feuilles sèches de *Juniperus oxycedrus* récoltées dans la région d'Amassine-Ourika, à une altitude de 1300 m, de Marrakech (Maroc), a atteint 0,01% (Achak, 2006).

Par ailleurs, le rendement en huiles essentielles est sous l'influence de facteurs divers, entre autres, l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude, le climat, la région de culture et la composition génétique des individus (Achak, 2006 ; Massei et al., 2006).

V.2.3. Caractérisation physicochimique

Les propriétés physico-chimiques telles que : la densité relative, le pouvoir rotatoire, l'indice de réfraction, etc. constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles essentielles.

V.2.3.1. Densité relative

Les densités relatives moyennes des huiles essentielles des feuilles et baies sèches de *J. phoenicea* (S1 et S2) mesurées à 20 °C sont égales à 0,97 et 0,88 respectivement, alors qu'elle est

égale à 0.93 pour les feuilles sèches de *J. oxycedrus*. Toutefois, on remarque bien que ces densités sont inférieures à celle de l'eau.

V.2.3.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction provient du phénomène de réfraction qui désigne le changement de direction de la lumière au passage d'un milieu à un autre. On a trouvé que cet indice est égal à 1,46 pour les baies et 1,47 pour les feuilles sèches de *J. phænicea* (S1 et S2). De plus, l'huile essentielle des feuilles sèches de *J. oxycedrus* a un indice de 1,46. Par ailleurs, l'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés (Boukhatem et *al.*, 2010).

V.2.3.3. Pouvoir rotatoire

Les huiles essentielles du genévrier de phénicie et d'oxycèdre sont plus solubles dans l'hexane et l'éthanol. On a trouvé que les pouvoirs rotatoires dans l'éthanol sont égales à + 9,50° et + 7,65° et dans l'hexane ils valent + 9,40° et + 8,25° pour les feuilles et les baies sèches de *J. phænicea* (S1 et S2) respectivement, ce qui montre bien que ces huiles essentielles sont dextrogyres. Par contre, le pouvoir rotatoire de l'huile des feuilles sèches de *J. oxycedrus* est égale à -8.2°, ce qui montre qu'il s'agit d'une huile essentielle lévogyre.

V.2.4. Composition chimique

Les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles étudiées par CG-DIF et CG-SM sont donnés aux tableaux 13, 14 et 15. Une première lecture de ces résultats montre bien que ces huiles représentent des mélanges complexes de composés chimiques (terpènes et dérivés, alcools, aldéhydes, phénols, etc.).

Chapitre IV _____ CARACTERISATION CHIMIQUE DES PLANTES ETUDIEES

Tab. 13 - Composition chimique des huiles essentielles de *Juniperus phœnicea* (site 1)

IR	Substances	Aire % Feuilles fraîches	Aire % Feuilles sèches	Aire % Baies	IR	Substances	Aire % Feuilles fraîches	Aire % Feuilles séchées	Aire % Baies
771	Toluène	-	-	0.2	1137	Oxyde d' α -Pinène isomère2	0.5	0.2	0.6
800	Hexanal	-	-	0.1	1156	<i>Trans</i> -Pinocarvéol	0.8	0.1	1.1
852	<i>Trans</i> -2-Hexenal	-	-	0.1	1158	<i>Cis</i> -Verbénol	2.0	-	-
854	<i>Cis</i> -3-Hexenol	0.1	-	0.2	1162	Camphre	0.7	0.1	1.9
932	Tricyclène	0.1	0.2	0.2	1166	Hydrate de Camphène	-	-	0.1
945	α -Pinène	29.6	55.9	56.6	1171	<i>Trans</i> -Verbénol	0.1	-	-
957	α -Fenchène	0.1	0.3	0.3	1176	Pinocamphone	0.2	-	-
960	Camphène	0.2	0.4	0.5	1178	<i>p</i> -Mentha-1,5-dièn- 8-ol	0.5	0.1	1.6
964	Thuja-2,4(10)-diène	0.1	0.2	0.2	1182	Bornéol	0.1	-	0.4
982	Sabinène	0.1	0.1	0.1	1188	Isogéranial	-	-	0.1
988	β -Pinène	0.5	0.8	1.0	1191	Terpinène-4-ol	0.9	0.2	1.1
993	Myrcène	0.7	1.8	2.0	1194	<i>p</i> -Cymène-8-ol	-	-	0.3
1013	α -Phellandrène	0.1	0.2	1.0	1195	Cymène-8-ol	0.6	-	-
1020	δ -3-carène	0.5	2.3	0.9	1201	Cryptone	0.1	-	-
1025	α -Terpinène	0.1	0.1	0.1	1203	α -Terpinéol	1.3	0.2	3.3
1033	<i>p</i> -Cymène	0.3	0.4	0.3	1211	Myrténol	0.1	0.1	0.3
1038	Limonène	0.5	0.7	0.9	1212	Myrténal	-	-	0.5
1040	β -Phellandrène	0.5	1.5	0.7	1226	Verbénone	0.9	0.1	1.9
1050	(<i>E</i>)- β -Ocimène	-	0.1	0.1	1230	<i>Trans</i> -Carvéol	-	-	0.7
1067	γ -Terpinène	0.1	0.3	0.3	1231	Citronellol	2.6	0.8	-
1081	<i>Trans</i> -oxyde de linalol	0.2	-	-	1257	Acétate de linalyle	-	0.6	0.3
1098	Terpinolène	0.4	0.5	0.6	1261	4- <i>Z</i> -decèn-1-ol	1.6	0.6	0.3
1103	Linalool	2.2	0.7	0.5	1266	<i>Cis</i> - acétate de chrysanthényl	-	-	0.1
1108	6-Camphénone	-	-	0.1	1269	Pipéritone	0.5	0.1	0.1
1112	Oxyde d' α -Pinène isomère1	-	-	0.1	1284	Acétate d'isopulegyle	0.8	0.6	0.3

Chapitre IV _____ CARACTERISATION CHIMIQUE DES PLANTES ETUDIEES

Tab. 13 (suite) - Composition chimique des huiles essentielles de *Juniperus phœnicea* (site 1)

IR	Substances	Aire % Feuilles fraîches	Aire % Feuilles sèches	Aire % Baies	IR	Substances	Aire % Feuilles fraîches	Aire % Feuilles séchées	Aire % Baies
1292	<i>Trans</i> - acétate d'oxyde de linalol	-	0.2	0.1	1517	β -Selinène	0.2	-	-
1292	Acétate d'oxyde de linalol	0.8	-	-	1522	γ -Amorphène	2.5	1.6	0.8
1299	acétate de bornyle	0.6	0.3	0.3	1542	Cubébol	0.1	0.4	0.2
1314	<i>2E,4E</i> -Decadiénol	0.9	0.3	0.2	1545	δ - Cadinène	2.4	1.6	0.9
1323	<i>2,4</i> -Decadièn-1-al	0.1	-	-	1547	Calamenène	1.0	0.4	0.2
1334	Carvacrol méthyl éther	0.4	-	-	1550	Zonarène	0.7	0.5	0.2
1344	Acétate de carvyle	0.2	0.1	-	1572	Elemol	2.6	0.9	0.6
1353	δ -Elemène	0.1	0.2	0.1	1619	Oxyde de caryophyllène	1.3	0.5	0.4
1361	Acétate d' α - terpényle	2.7	1.2	0.6	1645	Epoxyde II d'humulène	0.4	0.2	0.1
1366	α -Cubébène	0.1	0.1	0.1	1658	<i>1-epi</i> -Cubénol	4.3	1.9	0.9
1368	Acétate de néryle	0.1	-	-	1670	<i>t</i> -Cadinol + <i>t</i> - Muurool	1.4	0.5	0.3
1384	Geranyl acetate	0.1	-	-	1673	Cubenol	0.7	0.3	0.2
1398	α -Copaène	0.3	0.2	0.1	1683	α -Cadinol	1.8	0.4	0.4
1 411	β -Elemène	0.9	0.5	0.3	19 01	Nonandecane	0.2	-	-
1449	β -Caryophyllène	2.6	1.6	1.3	2001	Eicosane	0.4	-	0.6
1453	γ -Elemène	0.4	0.2	0.1	2014	Abiétal	-	1.7	-
1463	Thujopsène	0.5	0.4	0.1	2037	Oxyde de Manool	1.3	1.0	0.5
1483	α -Humulène	1.1	0.7	0.6	2087	Abiétadiène	-	0.3	0.8
1497	<i>7</i> α H, <i>10</i> δ H- Cadina-1(6),4- diène	1.0	1.0	0.4	2100	Heneicosane	0.4	-	0.8
1509	Germacrène D	2.1	1.7	1.5	Total		88.8	91.3	94.7

IR: Indice de rétention

Chapitre IV _____ CARACTERISATION CHIMIQUE DES PLANTES ETUDIEES

Tab. 14 - Composition chimique des huiles essentielles de *Juniperus phœnicea* (site 2)

IR	Substances	Aire % feuilles	Aire % baies	IR	Substances	Aire % feuilles	Aire % baies
932	Tricyclène	0,2	0,27	1229	Trans-carvéol	-	0,05
944	α -pinène	62,56	80,52	1230	Citronellol	0,42	-
957	α -fenchène	0,33	0,26	1257	acétate de linalyle	0,53	-
960	Camphène	0,55	0,49	1260	4-(Z)-decèn-1-ol	0,17	
964	Thuja-2,4(10) diène	0,31	0,14	1283	Acétate d'isopulegyle	0,2	-
982	Sabiène	-	0,22	1292	Acétate d'oxyde de linalol	0,1	-
988	β -pinène	1,07	1,58	1299	Acétate de bornyle	-	0,05
993	Myrcène	3,5	2,4	1354	δ -elemène	0,13	
1013	α -phellandrène	0,35	0,03	1360	Acétate d' α -terpényle	0,23	0,08
1019	δ -3-carène	1,92	0,6	1398	α -copaène	0,16	0,04
1025	α -terpinène	0,09	0,02	1410	β -elemène	0,56	0,29
1032	p-cymène	0,7	0,24	1428	α -gurjunène	0,07	0,16
1037	Limonène	1,33	0,61	1448	(E)- β -caryophyllène	1,67	1,96
1040	β -phellandrène	3,46	0,36	1452	γ -elemène	0,15	0,1
1050	E- β -ocimène	-	0,01	1463	(E)-b-farnesène	-	0,03
1066	γ -terpinène	0,27	0,04	1476	Cadina-3,5-diène	0,1	-
1097	Terpinolène	0,54	0,21	1482	α -humulène	0,66	0,7
1102	Linalool	1,14	-	1496	7_b_ H ,10_ H -Cadina-1(6),4-diène	0,48	-
1137	Epoxyde d' α -pinène	-	0,15	1498	γ -muurolène	0,24	
1155	Trans-pinocarvéol	0,08	0,19	1508	Germacrène D	1,51	2,06
1157	Cis-verbénol	-	0,23	1521	γ -amorphène	1,41	-
1161	Camphre	-	0,17	1522	α -muurolène	-	0,23
1177	p-mentha-1,5-dièn-8-ol	-	0,08	1542	cubébol	-	0,12
1182	Bornéol	-	0,03	1544	δ -cadinène	1,67	0,34
1190	Terpinèn-4-ol	0,08	0,1	1546	Calamenène	0,5	-
1194	p-cymèn-8-ol	-	0,04	1549	Zonarène	0,39	-
1202	α -terpinéol	0,44	0,26	1571	Elemol	1,13	0,39
1210	Myrtéol	-	0,04	1618	Oxyde de caryophyllène	0,58	0,44
1212	Myrténal	-	0,04	1644	Epoxyde II d'humulène	0,16	0,16
1225	Verbénone	-	0,07	1657	1-épi-cubéol	1,43	-
Total						94,8	96,97

Tab. 15 - Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Juniperus oxycedrus*

IR	Substance	Aire %	RI [#]	Substance	Aire %
932	Tricyclène	0.12	1296	Trans-anethol	0.04
943	α -pinène	33.41	1367	α -cubebène	0.18
957	α -fenchène	0.29	1398	α -copaène	0.31
959	Camphène	0.23	1410	β -elemène	1.12
963	Thuja-2,4(10)diène	0.14	1427	α -gurjunène	0.66
981	Sabinène	0.11	1445	β -copaène	0.29
988	β -pinène	0.97	1448	(E) β -caryophyllène	2.4
992	Myrcène	1.06	1452	γ -elemène	0.09
1012	α -phellandrène	0.04	1483	α -humulène	2.47
1019	d-3-carène	3.66	1499	γ -muurolène	2.8
1024	α -terpinène	0.03	1509	Germacrène D	23.66
1032	p-cymène	0.1	1522	γ -amorphène	1.18
1037	Limonène	0.43	1539	γ -cadinène	4.76
1039	β -phellandrène	0.17	1544	δ -cadinène	2.74
1066	γ -terpinène	0.03	1562	α -cadinène	0.36
1069	Octanol	0.04	1569	α -calacorène	0.11
1097	Terpinolène	0.33	1618	Oxyde de caryophyllène	0.39
1137	epoxide d' α -pinene	0.2	1644	Epoxyde II d'humulène	0.33
1154	trans-pinocarveol	0.2	1657	1-epi-cubénol	0.43
1157	Cis-verbénol	0.08	1668	T-cadinol	0.68
1161	Camphre	0.03	1683	α -cadinol	0.19
1177	p-mentha-1,5-dien-8-ol	0.18	1699	2,3-dihydrofarnesol	0.25
1190	Terpinen-4-ol	0.06	1728	Farnesal	0.15
1211	Myrtenal	0.09	1732	Farnesol	0.43
1229	Trans-carveol	0.04	1755	Farnesal isomer	0.23
1296	Trans-anethol	0.04	2037	Oxyde de manoylé	0.22
Total					88.51

En effet, les huiles essentielles des deux sites 1 et 2 sont riches en métabolites secondaires, mais avec quelques différences dans le nombre et les quantités des composés chimiques présents. On constate que les huiles essentielles des feuilles (F1) (fraîches et sèches) et les baies sèches (B1) de *J. phoenicea* du site 1 renferment 74, 61 et 72 des composés, soient 88,8%, 91,3% et 94,7 % respectivement. Par contre, l'analyse chimique des feuilles sèches (F2) et baies sèches (B2) de *J. phoenicea* du site 2 a permis l'identification de 44 et 46 composés, soient 94,8 % et 96,97 % respectivement. Par ailleurs, ces huiles sont dominées par l' α -pinène : F1 (feuilles fraîches: 29,6 % ; feuilles sèches: 55,9 %) et B1 (baies sèches: 56,6 %) vs F2 (feuilles sèches: 62,56 %) et B2 (baies sèches: 80,52 %). Toutefois, la composition de 50 échantillons d'huiles

essentielles des feuilles sèches de *J. phoenicea* var. *turbinata* récoltées en huit endroits de l'Algérie sont dominées par les monoterpènes (α -pinène 30,2 à 76,7 %) (Bekhechi et al., 2012). Les huiles essentielles des feuilles sèches de *J. phoenicea* du Maroc (Achak et al., 2008) et *J. phoenicea* var. *turbinata* de l'Espagne et du Portugal sont également riches en α -pinène (38,2%, 28,3% et 34,1%, respectivement) (Bahri et al., 2011). Dans une autre étude, Cavaleiro et al. (2006) confirme la richesse des feuilles sèches et baies du genévrier de phénicie du Portugal en monoterpènes dont l' α -pinène représente 66,7% et 48,2 %.

Ces huiles essentielles renferment d'autres composés mais à des quantités moindres par rapport au composé majoritaire (α -pinène). En effet, et à titre d'exemple, le δ -3-carène est présent dans nos échantillons aux concentrations de F1 : 2,3%, B1 : 0,9%, F2 : 1,92 % et B2 : 0,6% ; alors que l'huile essentielle des feuilles du Maroc en renferme 6,6% (Achak, 2006).

En ce qui concerne l'huile essentielle des feuilles sèches de *J. oxycedrus*, l'analyse chimique montre qu'elle renferme 52 composés dont l' α -pinène (33,41%) et le germacrène D (23,66%) représentent les composés majoritaires ; alors que l'oxyde de manoylène ne représente que (0,22%). Cette composition diffère quantitativement de l'huile essentielle des feuilles sèches de *Juniperus oxycedrus* de la région de Marrakech (Maroc): α -pinène (17,1%), oxyde de 13-épi-manoylène (12,5%) (Achak, 2006). Cependant, Adams (1998) rapporte dans ces travaux que toutes les huiles essentielles des espèces de *Juniperus* dans la section *Juniperus* (sect. *oxycedrus*) sont dominées par les monoterpènes (α -pinène, sabinène et limonène).

Par ailleurs, en comparant la composition de notre huile à celle obtenue par Adams (1998), on peut suggérer que notre genévrier oxycèdre est plus riche en α -Muuroène (2,8 % vs traces) et Germacrène D (23,66 % vs < 0,5%). Cette composition diffère aussi quantitativement de celle obtenue par (Dob, 2006), donc il peut s'agir d'un nouveau chimiotaxon issu d'une distribution géographique différente.

VI. Conclusion

La caractérisation chimique des espèces spontanées de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* de l'atlas saharien, au sud ouest de l'Algérie, nous a permis de connaître quelques caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles et le profil phytochimique de cette plante. En effet, les espèces étudiées contiennent des métabolites intéressants, tels que : flavonoïdes, alcaloïdes, tannins, saponosides, terpènes et stérols. Par ailleurs, l'utilisation de la CPG-SM dans l'analyse chimique des huiles essentielles, extraites par hydrodistillation à partir des feuilles et fruits, a

Chapitre IV _____ CARACTERISATION CHIMIQUE DES PLANTES ETUDIEES

révélé une richesse en espèces chimiques diversifiées. Cependant, l'alpha-pinène reste le composé majoritaire de ces huiles essentielles. De plus, l'espèce *J. oxycedrus* contient du delta-germacrène à un taux plus au moins élevé.

CHAPITRE V: ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

I. Introduction

Les huiles essentielles ont un large éventail de propriétés biologiques, telles que antimicrobienne, anticancéreuse, analgésique, antioxydante, anti-inflammatoire, etc. Dans le but de contribuer à la valorisation des cupressacées, nous allons essayer, dans ce présent chapitre, d'étudier l'activité antimicrobienne et l'effet antioxydant des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation, à partir des feuilles et baies de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* de l'atlas saharien.

II. Matériel et méthodes

II.1. Activité antimicrobienne

L'effet antimicrobien des huiles essentielles des feuilles et baies de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* a été testé sur des souches cliniques.

II.1.1. Les souches microbiennes

Il s'agit de quatre bactéries à gram négatif: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, une bactérie à gram positif: *Staphylococcus aureus* et d'une levure: *Candida albicans*. Ces souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital d'Ain Tadless à Mostaganem (Algérie). Elles ont été isolées à partir de patients hospitalisés infectés, puis identifiées à l'aide de galeries: API 20 E (Enterobacteriaceae), API Staph (*Staphylococcus aureus*).

II.1.1.1. L'antibiogramme

La sensibilité des souches microbiennes aux antibiotiques (ATB) a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose Muller-Hinton pour les souches bactériennes et la gélose Sabouraud + chloramphénicol pour la levure. On a préparé des suspensions microbiennes de 10^8 cellules/ml à partir de cultures jeunes dans une solution salée (0,85%) stérile, à une densité comprise entre 0,08 et 0,1 à 625 nm (Remmal et al., 1993). Après ensemencement des boîtes de Petri (témoins et tests), on a déposé les disques d'ATB dans les boîtes de cultures à tester (tableau 16), puis on a incubé à 37°C pendant 24H. Après incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés et comparés aux diamètres critiques (d et D) de références.

Chapitre V _____ ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

La classification des souches bactériennes en catégories cliniques: Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I) aux antibiotiques est définie par le comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM, 2011). Toutefois, en l'absence de toute norme officielle, en tant que référence pour l'interprétation des tests antifongiques, les diamètres critiques pour la sensibilité aux substances antifongiques de référence a été subjectivement fixée à ≥ 17 mm pour les triazoles et ≥ 15 mm pour l'amphotéricine B. Les souches fongiques sont considérées comme résistantes quand les diamètres sont ≤ 13 mm pour les triazoles et ≤ 12 mm pour l'amphotéricine B (Amar et al., 2013).

En ce qui concerne la catégorisation des souches vis-à-vis l'effet antimicrobien des huiles essentielles, les diamètres des zones d'inhibition ont aussi été subjectivement fixés à ≤ 12 mm pour les souches résistantes,]12mm – 18mm] pour une sensibilité intermédiaire et > 18 mm comme sensibles (Ponce et al., 2003 ; De Billerbeck, 2007 ; Rusenova et Parvanov, 2009 ; Upadhyay et al., 2010).

Tab. 16 – Les antibiotiques testés

Les antibactériens	Les antifongiques
Céfazoline (30 μ g)	Amphotéricine B (100 μ g)
Amoxicilline + Acide Clavulanique (20/10 μ g)	Econazole (50 μ g)
Oxacilline (5 μ g)	Miconazole (50 μ g)
Néomycine (30 μ g)	Clotrimazole (50 μ g)
Gentamicine (30 μ g)	Flucytosine (1 μ g)
Acide nalidixique (30 μ g)	
Chloramphénicol (30 μ g)	
Ampicilline (10 μ g)	
Sulfaméthoxazole-triméthoprimine (1.25/23.75 μ g)	
Colistine (10 μ g)	
Norfloxacine (5 μ g)	
Pristinamycine (15 μ g)	
Erythromycine (15 μ g)	
Doxycycline (30 μ g)	

II.1.1.2. L'aromatogramme (méthode de Vincent)

On a procédé avec la même technique de l'antibiogramme, mais en remplaçant les disques d'ATBs par des disques de papier Watman de 6mm de diamètre. On a imbibé chaque disque par 6µl d'huile essentielle à tester. Pour permettre une bonne diffusion de l'huile essentielle, les boîtes de Petri sont laissées reposer pendant 30min à la température ambiante avant d'être incubées à 37°C pendant 24H. Tous les tests sont réalisés en triplicata et des cultures sans huiles essentielles ont servi de témoin pour chaque test (Remmal et *al.*, 1993).

II.1.1.3. La méthode de contact direct

Les tests antimicrobiens ont été réalisés selon le procédé décrit par (Remmal et *al.*, 1993). Cette technique permet la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). En effet, les huiles essentielles sont émulsionnées avec une solution d'agar-agar 0,2%, afin de disperser les composés et à améliorer leur contact avec les germes à tester. On a préparé une série de tubes à essai contenant chacun 13.5 ml de gélose Mueller Hinton pour les bactéries et le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) pour les levures. Ces tubes sont stérilisés à 121°C pendant 20min et refroidis à 45°C, puis additionnés chacun d'un volume de 1,5 ml d'une dilution (huile essentielle + solution agar 0,2%), ainsi on obtient une gamme de dilutions couvrant toutes les concentrations à tester. Par ailleurs, l'ensemencement des bactéries et des levures a été fait à partir de suspensions de cultures jeunes de 10⁸ unités formants colonies/ml, sous forme de stries pour les premières et par étalement pour les deuxièmes. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 27 °C pendant 48 heures pour les levures. En outre, tous les tests ont été effectués en triple et on a utilisé des témoins afin de vérifier la croissance des différentes souches. Toutefois, la CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle ne donnant aucune croissance visible à l'œil nu (Kaloustian et *al.*, 2008).

II.2. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été déterminée par la méthode au DPPH (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl).

II.2.1. Principe

Il s'agit d'une méthode spectrophotométrique. En présence de piègeurs (donneurs de

proton) des radicaux libres, le DPPH[•] (capteur de proton) de couleur violette se réduit en DPPH de couleur jaune. La diminution de coloration de la solution, qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant, est mesurée à 517 nm et l'activité antioxydante de l'échantillon (antioxydant) est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition (Emami et *al.*, 2011).

II.2.2. Protocole

Cent microlitres (100 µl) de chaque dilution de l'huile essentielle ont été mélangés avec 2.9 ml de la solution de méthanol de DPPH[•] à 0.004% (p/v) dans des tubes à essai secs. Après 30 min d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 100 µl de méthanol 95% et de 2.9 ml de la solution de DPPH[•]. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celles de l'huile essentielle. Tous les tests ont été réalisés en triplicata et le pouvoir de réduction est calculé par la formule suivante :

$$\text{PR \%} = (\text{A}_C - \text{A}_E) / \text{A}_C \times 100$$

PR: pouvoir de la réduction en % ;

A_C: absorbance de la solution de DPPH[•] en absence de l'huile essentielle et de la vitamine C ;

A_E: absorbance de la solution de DPPH[•] en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine C.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle ou de la vitamine C, permet de tracer la courbe de la régression linéaire et de calculer la concentration efficace CE50 par extrapolation ou à partir de l'équation de cette régression. La CE50 est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle (ou de la vitamine C) nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel (Al-Reza, 2009 ; Daouda, 2015).

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats de l'antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme (tableau 17) ont montré que les souches testées ont généralement une sensibilité similaire aux souches comparables (Jacob et *al.*, 1979), à

Chapitre V _____ ACTIVITES BIOLOGIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

quelques exceptions près: les deux souches *E. coli* et *S. aureus* étaient résistantes au doxycycline. On a constaté qu'aussi *P. aeruginosa* était la souche la plus résistante, elle a été inhibée par trois antibiotiques (gentamicine, colistine, norfloxacine) seulement ; alors que *S. aureus* était la souche la plus sensible, vu le nombre limité d'antibiotiques qui l'ont inhibé (acide nalidixique, colistine, doxycycline), ainsi que l'étendue de la zone d'inhibition exprimée par un diamètre élevé. Par ailleurs, *C. albicans* n'était sensible qu'à l'éconazole et le miconazole.

Tab. 17 – Phénotypes de résistance des souches microbiennes testées.

Antibiotiques et antifongiques	Bactéries					Levure
	EC	KP	PM	PA	SA	CA
Céfazoline (30 µg)	S	S	S	R	S	-
Amoxicilline + Acide Clavulanique (20/10 µg)	S	S	I	R	S	-
Oxacilline (5 µg)	R	R	R	R	S	-
Néomycine (30 µg)	S	S	R	R	S	-
Gentamicine (30 µg)	S	S	S	S	S	-
Acide nalidixique (30 µg)	S	S	S	R	R	-
Chloramphénicol (30 µg)	S	S	I	R	S	-
Ampicilline (10 µg)	S	R	R	R	R	-
Sulfaméthoxazole-triméthoprim (1.25/23.75 µg)	R	S	S	R	S	-
Colistine (10 µg)	S	S	R	S	R	-
Norfloxacine (5 µg)	S	S	S	I	S	-
Pristinamycine (15 µg)	R	R	R	R	S	-
Erythromycine (15 µg)	R	R	R	R	S	-
Doxycycline (30 µg)	R	S	R	R	R	-
Amphotéricine B (100 µg)	-	-	-	-	-	R
Econazole (50 µg)	-	-	-	-	-	S
Miconazole (50 µg)	-	-	-	-	-	S
Clotrimazole (50 µg)	-	-	-	-	-	R
Flucytosine (1 µg)	-	-	-	-	-	R

EC = *Escherichia coli*, KP = *Klebsiella pneumoniae*, PM = *Proteus mirabilis*,

PA = *Pseudomonas aeruginosa*, SA = *Staphylococcus aureus*, CA = *Candida albicans*.

S = sensible, I = intermédiaire, R = résistante.

III.2. Résultats de l'aromatogramme

Les résultats de l'aromatogramme sont représentés par la figure 21. On a constaté que l'espèce *E. coli* semble être la plus sensible à toutes les huiles essentielles testées avec des diamètres qui fluctuent entre 24 et 35mm. En comparaison avec quelques substances antimicrobiennes de référence, aucune des huiles essentielles n'a pu inhiber significativement la croissance de *P. mirabilis*. En fait, les huiles essentielles des feuilles sèches de des *J. phoenicea* et des baies *J. phoenicea* du site 2 ont montré une activité intermédiaire envers *P. mirabilis*, bien que l'activité antibactérienne de celles des feuilles sèches *J. phoenicea* des deux sites et des baies de *J. phoenicea* du site 2 vis-à-vis les autres souches testées, spécialement *S. aureus*, est avérée être excellente. Par contre, l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* a été moins efficace contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition égal à 18mm.

L'huile essentielle des baies de *J. phoenicea* du site 1 était inefficace contre la plupart des souches testées sauf *K. pneumonia* (activité intermédiaire) et *E. coli*. En outre, *S. aureus* était modérément sensible à l'huile essentielle des feuilles fraîches de cette plante. En ce qui concerne l'activité antifongique, les huiles essentielles des feuilles sèches des deux sites et des baies de *J. phoenicea* du site 2 ont surpassé les substances antifongiques standards, alors que l'huile essentielle des feuilles fraîches a montré une activité similaire à celle de l'éconazole et le miconazole. En revanche, l'huile essentielle des baies de *J. phoenicea* du site 1 a été moins efficace contre le *C albicans* avec un diamètre de 12mm. Les présents résultats sont relativement comparables à ceux d'autres études évaluant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de certaines sous-espèces du genre *Juniperus* (Bouzouita et al., 2008).

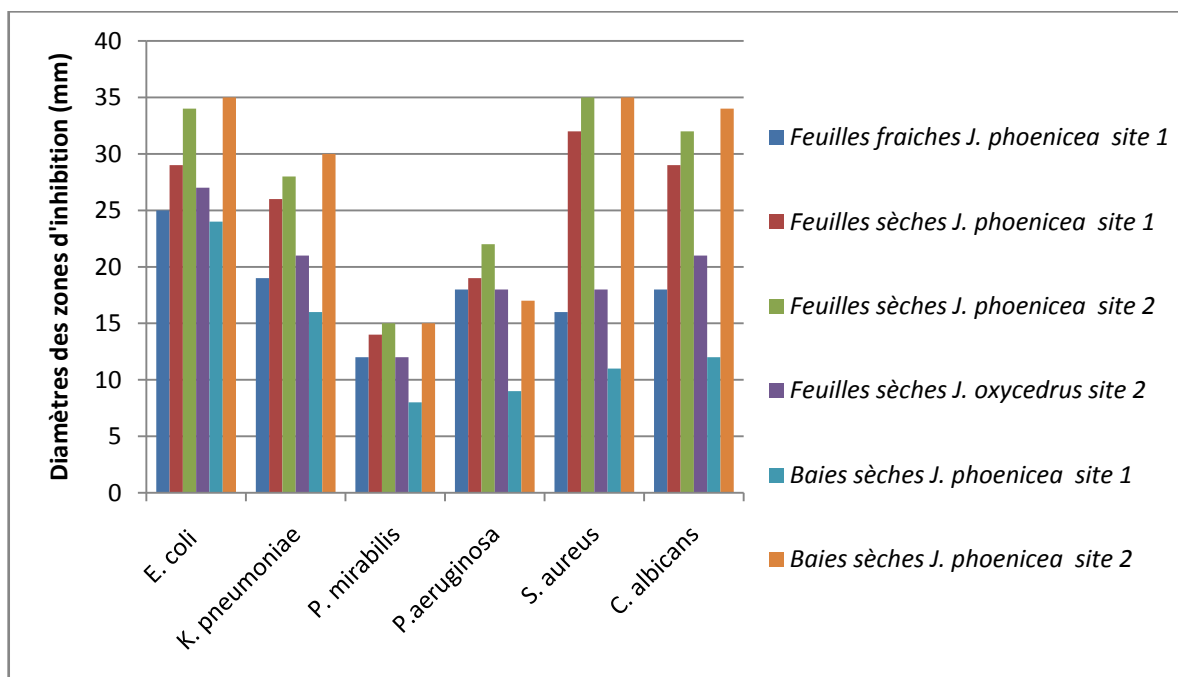


Fig. 21 – Diamètres des zones d’inhibition des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*

III.3. Résultats de la méthode de contact direct

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) en $\mu\text{g} / \text{ml}$ des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* obtenues par la méthode de contact direct sont représentés dans le tableau 18. Il est bien démontré dans la littérature que les valeurs du log CMI sont fortement corrélées avec les diamètres des zones d’inhibition (Pearson $R = 0,9892$). Ainsi, les limites pourraient être fixées à $\geq 2760 \mu\text{g} / \text{ml}$ pour les souches résistantes et $\leq 552 \mu\text{g} / \text{ml}$ pour les souches sensibles.

Tab. 18 - Concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/ml}$) des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*.

Matériel végétal	Espèces	Concentrations inhibitrices minimales ($\mu\text{g/ml}$) des huiles essentielles					
		EC	KP	PM	PA	SA	CA
Feuilles fraîches	<i>J. phoenicea</i> site 1	276	552	2760	552	1380	552
Feuilles sèches	<i>J. phoenicea</i> site 1	69	138	1380	552	27,6	69,00
	<i>J. phoenicea</i> site 2	55,2	69	552	276	13,8	27,6
	<i>J. oxycedrus</i> site 2	138	inactive	2760	inactive	inactive	138
baies sèches	<i>J. phoenicea</i> site 1	276	1380	inactive	inactive	2760	2760
	<i>J. phoenicea</i> site 2	138	552	1380	1380	552	138

EC = *Escherichia coli*, KP = *Klebsiella pneumoniae*, PM = *Proteus mirabilis*,

PA = *Pseudomonas aeruginosa*, SA = *Staphylococcus aureus*, CA = *Candida albicans*.

L'huile essentielle des feuilles sèches de *J. phoenicea* (sites 1 et 2) ont montré une meilleure activité contre les souches testées, alors qu'elles avaient, à l'exception de celles de *J. phoenicea* (sites 2), une activité intermédiaire (CMI = 1380 $\mu\text{g/ml}$), semblable à celle des baies de *J. phoenicea* (sites 2), contre *P. mirabilis*. Cette même espèce bactérienne c'est montrée résistante à la fois aux huiles essentielles des feuilles fraîches et baies de *J. phoenicea* (site 1) et des feuilles sèches de *J. oxycedrus*. En outre, l'huile essentielle des feuilles de *J. oxycedrus* était inactive vis-à-vis *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. De même, l'huile essentielle des baies de *J. phoenicea* (site 1) est avérée inactive contre *P. aeruginosa*. Néanmoins, *S. aureus* et *C. albicans* se sont montrées résistantes à l'huile essentielle des baies de *J. phoenicea* (site 1), alors que les huiles des feuilles fraîches de *J. phoenicea* (site 1) et des baies de *J. phoenicea* (sites 1 et 2) ont modérément inhibé la croissance de *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* respectivement. Parmi toutes les souches testées, *E. coli* était la plus sensible aux différentes huiles essentielles avec des CMI comprises entre 55,2 et 276 $\mu\text{g/ml}$. De même, *C. albicans* s'est avéré sensible à toutes les huiles, sauf à celle des baies de *J. phoenicea* (site 1). Par conséquent, on a constaté qu'en général les huiles essentielles des feuilles de *J. phoenicea* possèdent une activité antimicrobienne supérieure à celle des baies, avec quelques différences relatives entre *J.*

phoenicea du site 1 et *J. phoenicea* du site 2, d'une part, et que les huiles essentielles de *J. oxycedrus* ont un pouvoir antimicrobien qui se situe entre celui des feuilles et baies de *J. phoenicea* d'autre part. Cependant, l'interprétation de ces différences intraspécifique et interspécifique pourrait avoir plusieurs origines, vu la complexité de la composition chimique des huiles essentielles et les interactions (synergétique ou antagoniste) qui pourraient avoir lieu entre les espèces chimiques différentes.

En effet, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* de l'Algérie pourrait être associée à la quantité des terpènes et de leurs composés majoritaires (par exemple α -pinène, myrcène, β -pinène, linalol, myrcène, β -phellandrene et germacrene D). Ces composés possèdent une forte activité antimicrobienne (Deba et al., 2008 ; Derwich et al., 2010 ; Mansouri et al., 2010 ; Mazari et al., 2010 ; Devendra, 2011 ; Ramdani et al., 2013), en attaquant à la membrane plasmique, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité et la perte de constituants cellulaires (Jacob et al., 1979 ; Knobloch et al., 1989 ; Denyer et Hugo, 1991 ; Sikkema et al., 1994). De surcroît, il a été rapporté que l' α -pinène, qui est le composé majoritaire de *Juniperus phoenicea*, présente plusieurs activités biologiques: il est antibactérien, anti-inflammatoire, antiviral, expectorant, sédatif, herbicide et insectifuge (Akrou, 1983). La résistance de certaines espèces, telles que *S. aureus*, *P. mirabilis* et *P. aeruginosa* aux huiles essentielles est liée à leur capacité à développer une résistance contre de nombreux agents antimicrobiens, d'où leur implication fréquente dans les infections nosocomiales. Par ailleurs, les résultats de cette étude sont en accord avec ceux obtenus par Cavaleiro et al. (2006) en étudiant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de certaines espèces de genévrier sur un certain nombre de micro-organismes d'une part, et comparés avec les huiles essentielles de *J. phoenicea* du Maroc ont montré une meilleure activité antimicrobienne (Ait-Ouazzou et al., 2012) d'autre part.

III.4. Résultats de l'activité antioxydante

Les graphes 1 à 7 (annexes 1 & 2) représentent la variation du pourcentage de réduction de DPPH en fonction de la concentration de l'huile essentielle des feuilles et baies de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*. Ces graphes montrent bien que le pourcentage d'inhibition ou de piégeage des radicaux libres DPPH augmente proportionnellement avec la concentration de l'huile essentielle. Cependant, la concentration à partir de laquelle 50% des radicaux libres ont été réduits est presque la même pour les huiles essentielles des feuilles de *J. phoenicea* des deux

sites (1 et 2) et de *J. oxycedrus* avec une valeur moyenne de $22,51 \pm 0,74 \mu\text{g/ml}$ plus au moins supérieure à la CE50 de la vitamine C ($35,57 \pm 2,47 \mu\text{g/ml}$); alors que le pouvoir antioxydant des baies de *J. phoenicea* des deux sites (1 et 2) est trois fois inférieure à celui des feuilles, avec une CE50 moyenne de $65,30 \pm 3,24 \mu\text{g/ml}$ (figure 22).

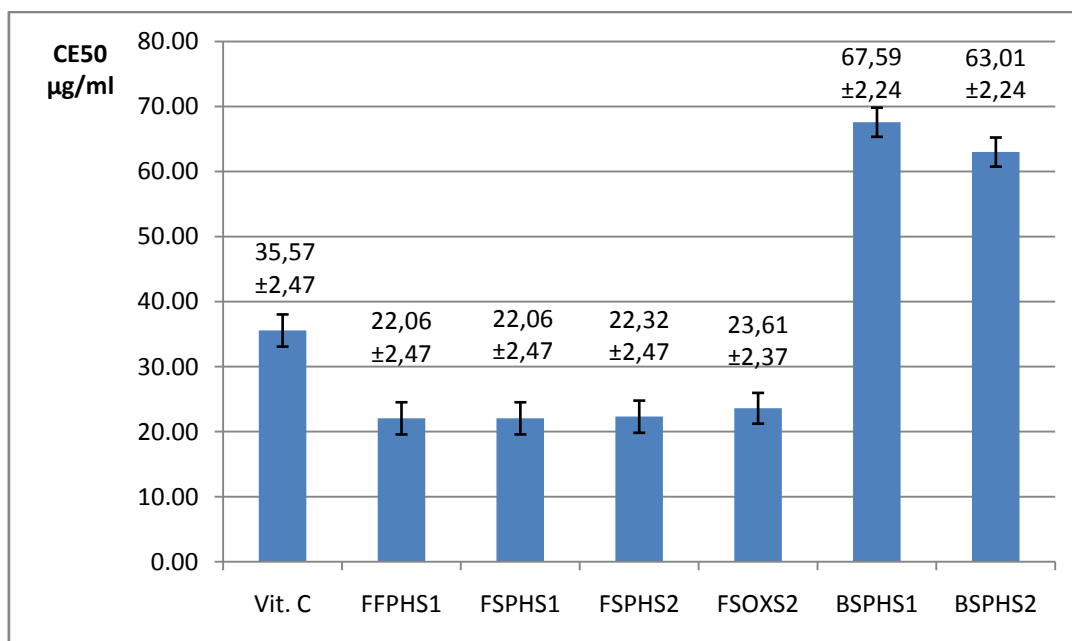


Fig. 22 – Concentrations efficaces 50 de la vitamine C et des huiles essentielles des espèces étudiées.

Vit C : vitamine C ; FFPHS1 : feuilles fraîches *J. phoenicea* site1 ; FSPHS1 : feuilles sèches *J. phoenicea* site1 ; FSPHS2 : feuilles sèches *J. phoenicea* site2 ; FSOXS2 : feuilles sèches *J. oxycedrus* site2 ; BSPHS1 : baies sèches *J. phoenicea* site1 ; baies sèches *J. phoenicea* site2.

Par ailleurs, Sayyed et al. (2011) ont comparé l'activité antioxydante des huiles essentielles des feuilles et baies de *Juniperus excelsa* subsp. *polycarpos* (pieds mâles (FM) et femelles (FF, Bp)) et des feuilles (F) et baies (Be) de *J. excelsa* subsp. *excels* avec plusieurs standards à la concentrations de $4 \mu\text{l/ml}$ et les valeurs obtenues sont: Quercétine 77,7%, Vitamine C 38,7%, γ -Terpinène 17,7%, Cedrol 3,1%, δ -2-Carène 13,3%, δ -3-Carene 4,8%, β -Pinène 1,0%, α -Pinène (non actif), Sabinène 5,1%, FM 9,80%, FF 16,80%, Bp 1,40%, F 8,20% et Be 6,60%. Une première analyse de ses résultats a montré qu'effectivement l'activité des huiles

essentielle des feuilles est supérieure à celles des baies. Par contre, en se référant aux équations de la régression linéaire (annexe 1 & 2), on a constaté que les résultats du pouvoir antioxydant des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* de l'atlas saharien sont beaucoup plus meilleurs, puisque à une concentration de 0,01µl/ml près en huile essentielle, on obtient presque les mêmes résultats de Sayyed et *al.* (2011). De même, Loizzo et *al.* (2007) ont obtenu des CE50 avec les huiles essentielles du bois et fruits de *Juniperus oxycedrus* ssp. *Oxycedrus* du Liban égales à 1,45 µl/ml et 7,42 µl/ml respectivement.

De surcroît, Abdel Ghany et Hakamy (2014) rapportent que l'activité antioxydante des fruits de *Juniperus procera* est due à la présence de limonène, γ -terpinène, caryophyllène, germacrène D et l' α -humulène. Néanmoins, l'activité antioxydante d'une huile essentielle dépend beaucoup de sa composition chimique d'une part, et d'autre part de la sensibilité des méthodes mises en œuvre pour la mettre en évidence et de l'évaluer (Miguel, 2010). Par conséquent, les huiles essentielles des espèces de *Juniperus* sélectionnées dans notre étude sont riches en composés terpéniques et phénoliques, ce qui pourrait justifier l'activité antioxydante plus au moins élevée de cette plante.

IV. Conclusion

Il est bien démontré que les huiles essentielles possèdent des activités biologiques diversifiées, entre autres (antimicrobienne, antiparasitaire, insecticide, antidiabétique, anti-inflammatoire, etc.). Les résultats de l'activité antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* de l'atlas saharien viennent une autre fois consolider l'utilisation empirique de ces plantes dans la médecine traditionnelle et la conservation des denrées alimentaires. En effet, ces huiles essentielles ont donné des résultats fort intéressants, pour être exploitées dans de nombreux domaines (pharmaceutique, cosmétique, alimentaire, etc.), comme substituts aux substances de synthèse (antibiotiques, additifs alimentaires, ...) qui ne sont pas sans danger sur la santé.

*Conclusion générale
et perspectives*

Conclusion générale et perspectives

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des cupressacées, poussant à l'état spontané dans l'Atlas saharien. Il est bien établi que les cupressacées représentent une famille d'essences forestières intéressantes sur les plans : écologique et socio-économique. Néanmoins, les travaux d'exploration et d'inventaire en Algérie, malgré insuffisants et imprécis, ont fait constat d'un recul du nombre de peuplements forestiers naturels conséquent à de multiples facteurs (activités anthropiques, changements climatiques, catastrophes naturelles, incendies, etc.). Par ailleurs, les monts Ksouriens de l'Atlas saharien contiennent encore quelques peuplements de genévrier : genévrier de phénicie et genévrier oxycèdre.

L'objectif que nous nous sommes fixé est de contribuer à la caractérisation chimique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* de la région d'Ain sefra (wilaya de Naâma) d'une part, et d'autre part d'en évaluer l'activité antimicrobienne et le pouvoir antioxydant.

A l'issue des résultats de l'enquête ethnopharmacologique sur le genévrier de l'atlas saharien, réalisée au sud ouest de l'Algérie, il s'avère que le *J. phoenicea* est la plante la plus utilisée en médecine traditionnelle par rapport au *J. oxycedrus*. Les feuilles et les baies du genévrier de phénicie ou araâr sont conseillés dans la prévention et le traitement de nombreuses affections, entre autres : diabète de type 2, anti-diarrhéique, maladies de la peau (eczéma), anti-colique, anti-psoriasis, carminatifs, antiseptiques, diurétique, tonique et anti-inflammatoires, etc.; alors que son bois avec celui du genévrier oxycèdre est utilisé dans la préparation du goudron végétal ou gatrane, très recommandé pour le soin les affections dermiques ou lutter contres certains parasites chez l'homme et l'animal.

Par ailleurs, le criblage phytochimique a révélé la présence de la plupart des classes de métabolites secondaires: flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, Saponosides, terpènes et stérols. On a constaté aussi que les fruits de *J. phoenicea* renferment plus d'huile essentielle (2 à 2,5%) que les feuilles. Par contre, les feuilles de *J. oxycedrus* n'en contiennent que (0,1 %). De surcroît, l'analyse des huiles essentielles par CPG-SM a montré quelles sont riches en composés chimiques (44 à 74 espèces chimiques), avec une prédominance de l' α -pinène dans toutes les espèces étudiées: feuilles (33 - 62 %), fruits (56 – 80 %).

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, les huiles essentielles des feuilles sèches de *J. phoenicea* se sont montrées plus actives que celles des baies. Elles ont manifesté un effet antimicrobien important contre la majorité des souches testées (bactéries et levure); alors que celles des feuilles sèches de *J. oxycedrus* ont une activité presque semblable à celle des baies de *J. phoenicea*.

A propos de l'effet antioxydant, les huiles essentielles des baies de *J. phoenicea* sont trois fois moins efficaces que les huiles essentielles des feuilles sèches de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus*. Cependant, toutes huiles essentielles des feuilles ont révélé une activité antioxydante plus au moins supérieure à celle de la vitamine C.

Enfin, l'ensemble de ces résultats prometteurs nous incite à prendre soin des forêts en général; et le genévrier en particulier. Désormais, il faut réagir pour préserver et réhabiliter le genévrier dans l'atlas saharien. De plus, il est souhaitable d'envisager d'autres études approfondies pour mettre en évidence les effets biologiques et les vertus médicinales de cette plante et de ses huiles essentielles.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel Ghany T. M. and Hakamy O. M., 2014. *Juniperus procera* as Food Safe Additive, their Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Activity against Some Food-Borne Bacteria. *J. Biol. Chem. Research*. Vol. 31, No. 2: 668-677, 31 (668).
- Achak N., 2006. Contribution à la valorisation des substances naturelles : Etude des huiles essentielles des cupressacées de la région tensift Al haouz-Marrakech. Thèse de Doctorat. Université Kaddy ayad. Maroc. 240 p.
- Adams R. P., 1998. The leaf essential oils and chemotaxonomy of *Juniperus* sect. *Juniperus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 637-645.
- Adams R. P., 2000. Systematics of *Juniperus* based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochemical Systematics and Ecology* 28. 515-228.
- Adams R. P., 2004. *Junipers of the World: The Genus Juniperus*. 4th Edition, Trafford Publishing, Vancouver, B. C.
- Adams R. P., Julie A. Morris, Ram N. Pandey and Andrea E. Schwarzbach, 2005. Cryptic Speciation between *Juniperus deltoides* and *Juniperus Oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean. *Biochemical Systematics and Ecology* 33(8): 771–87.
- Adams R. P. and Boratynski A., 2014. Geographic Variation in the Leaf Essential Oil of *Juniperus turbinata* from throughout its range in the Mediterranean. 96(3): 149–58.
- AFNOR, 1992. Recueil des normes françaises ; huiles essentielles. Revue annuelle, N° 11, INRAA. El-Harrach, Alger, 289.
- Ait Ouakrouch I., 2015. Enquête ethnobotanique à propos des plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète de type II à Marrakech. Thèse de Doctorat en médecine. Marrakech, Maroc, 126p.
- Ait-Ouazzou A., Loran S., Arakrak A., Laglaoui A., Herrera A., Pagan R. and Conchello P., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45, 313-319.
- Akrouf A., 1983. Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). In: Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 289-292 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62).

- Al-Reza S.M., Rahman A. and Kang S.C., 2009. Chemical composition and inhibitory effect of essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. on food-borne pathogens. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(6), pp.1176–1182.
- Amar C.S., Ashish J. and Hajare V., 2013. Study of prevalence and antifungal susceptibility of *Candida*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2): (B) 361 - 381.
- Amirouche N, Bouguedoura N et Hadj-Arab H., 2010. Botanique: Les embryophytes. Alger, OPU, 104 p.
- Bahri F., Romane A., Arjouni Y., Harrak R., El Alaoui and El Fels A., 2011. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Moroccan *Juniperus phoenicea*. *Natural Product Communications*, 6, 1515-1518.
- Bakchiche B., Gherib A., Maatallah M. and Miguel M. G., 2014. Chemical composition of essential oils of *Artemisia campestris* and *Juniperus phoenicea* from Algeria. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. Vol. 9 No. 4 Dec. 2014, pp. 1434-1436.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M., 2008. Biological Effects of Essential Oils--a Review. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46(2): 446–475.
- Banks J. C. G., 2004. Southern Hemisphere Conifers. In: *Tropical Ecosystems*: 1712–1719.
- Batish DR., Singh HP., Kohli RK. and Kaur S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256, 2166–2174.
- Bekhechi C., Atik Bekkera F., Consiglio D. and Bighelli A. Tomi F., 2012. Chemical variability of the essential oil of *J. phoenicea* var. *turbinata* from Algeria, *Chemistry & Biodiversity*, 9, 2742-2753.
- Beneteaud E., 2011. Les techniques d'extraction. Comité français du parfum, pp. 1-7.
- Bertaudière-Montes V. and Montès N., 2004. *Le Genévrier*, éd. Actes Sud, *Le Nom de l'arbre*, 96 pp.
- Bhar H et Balouk A., 2011. Plantes Aromatique et Médicinales Du Maroc. *L'espace marocain*, 68, 20 – 46.
- Boti J. B., Bighelli A., Cavaleiro C., Salgueiro L. and Casanova J., 2006. Chemical Variability of *Juniperus Oxycedrus* Ssp. *Oxycedrus* Berry and Leaf Oils from Corsica, Analysed by Combination of GC, GC-MS and ¹³C-NMR. *Flavour and Fragrance Journal* 21(2): 268–73.

- Boualala M., Bradai L. et Abid M., 2014. Diversité et utilisation des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien dans la pharmacopée saharienne. Cas de la région de souf. *Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes* Vol.7n°2 (2014) : 18 – 26
- Boudy P., 1955. *Economie forestière Nord Africain. IV. Description forestière de l'Algérie et de la Tunisie.* Ed. Larose, Paris, 438 p.
- Boukhatem M., Hamaidi M., Saidi F., 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, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie, *nature et technologie*, n°3, pp: 39-41.
- Bouquet A., 1962. Rapport préliminaire sur les alcaloïdes des Rubiacées de Côte d'ivoire. Rapport O.R.S.T.O.M. Abidjan, Multig. p. 8.
- Bouzouita N, Kachouri F, Ben Halima M et Chaabouni M., 2008. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
- Bruneton J., 2009. *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.* 4e éd, Lavoisier, Paris, p 1269.
- Buckle J., 1997. *Clinical aromatherapy. Essential oils in practice* 2nd ed. United States of America, 424 p.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Caron M., 2013. Les conifères, des végétaux datant de l'ère carbonifère. *Futura-Sciences*, 1–21.
- Carré P., 1953. *Précis de technologie et de chimie industrielle.* T3. Ed. Ballière JB. et fils. 432 P.
- Cavaleiro C., Pinto E., Gonçalves M. J. and Salgueiro L., 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072: 1333-1338.
- Chevallier A., 1997. *Encyclopédie des plantes médicinales.* Larousse, Paris, 335p.
- Collignon-Trontin A. M., 2000. Etude des variations moléculaires chez l'Epicéa commun (*Picea abies* (L.) Karst.) à l'aide de marqueurs RAPD. Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré, NANCY-I, 165p.
- Cosson E., 1879. *Le règne végétal en Algérie.* Ed. A. Quantin, Paris, 88p.

- Dambolena J. S., Zunino M. P., López A. G., Rubinstein H. R., Zygadlo J. A., Mwangi J. W., Thoithi G. N., Kibwage I. O., Mwalukumbi J. M., & Kariuki S. T., 2010. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 410–414.
- Daouda T., 2015. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de cote d'ivoire. Thèse de doctorat. Organic chemistry. Université Felix Houphoeut Boigny, Cote d'Ivoire, 154p.
- De Billerbeck V-G., 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques *Phytothérapie*, Vol. 5, pp 249-253.
- Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. and Tawatu S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata*. *Journal of Food Control*, 19, 346-352.
- Denyer SP, Hugo WB., 1991. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. *In Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. Edited by Denyer SP, Hugo WB. Oxford, The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication: 171–188.
- DerMarderosian A. and Beutler J., 2004. *The Natural Review of Products*. St. Louis, MO: Facts and Comparisons. USA. 753p.
- Derwich E, Benziane Z. and Boukir A., 2010. Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12, 199–204.
- Devendra M., Shivani J., Sangeeta P.S., Abhimanyu D. and Ganga B., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Senecio rufinervis* DC, (Asteraceae). *Indian Journal of Natural Products and Resources*. Vol. 2(1): 44
- Djebaili H., Zellagui A. and Gherraf N., 2013. Germacrene-D a characteristic component of the Essential Oils from the Leaves of *Juniperus oxycedrus* ssp . *macrocarpa* (S . et Sm .) Ball Growing in El Kala. , *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 3 (1):40-44.
- Dob T., Dahmane D. and Chelghoum C., 2006. Essential oil composition of *Juniperus oxycedrus* Growing in Algeria. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 44, No. 1. Taylor & Francis. pp: 1-6.
- Duval L., 2012. *Les Huiles Essentielles à l'officine*. Thèse de doctorat. UFR DE médecine et de pharmacie de Rouen. France. 153p.

- El ayoubi E. A., Ouahidi I., El mansouri L., Daoudi A. and Bousta D., 2016. Ethnopharmacological survey of plants used for immunological diseases in four regions of Morocco. *European Journal of Medicinal Plants* 13(1):1–24.
- El Maataoui M and Pichot C., 1999. Nuclei and cell fusion cause polyploidization in the mégagamétophyte of common cypress, *Cupressus sempennrens* L. *Planta* 208 : 345-351.
- Emami S. A., Abedindo B.F. and Hassanzadeh-Khayyat M., 2011. Antioxidant Activity of the Essential Oils of Different Parts of *Juniperus excelsa* M. Bieb. subsp. *excelsa* and *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *polycarpus* (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(4), pp.799–810.
- Enright N. J., Hill R. S., and Veblen T. T., 1996. The southern conifers - An introduction. *Ecology of the Southern Conifers*. Washington, D.C., USA: Smithsonian Institution Press, pp. 1-9.
- Figueredo G., 2007. Étude chimique et statistique de la composition d’huiles essentielles d’origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d’origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal, France, 417p.
- Guillon Y., 2010. Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula*: aspects évolutifs et physiologiques. Thèse de Doctorat, Université Saint-Etienne, France, 254 p.
- Haluk J. et Roussel C., 2000. Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées. Application potentielle en préservation du bois. *Annals of Forest Science*, 57, pp.819–829.
- Hamza N., 2011. Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. Algérie. 169p.
- Harfouche A., Nadjahi A., Ellatifi M. et Daly-Hassen H., 2005. Les Ressources Génétiques Forestières Nord-Africaines et Leur Conservation. *Revue Forestière Française* (1), pp. 15-32.
- Hernandez Ochoa L.R., 2005. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combiné “solvant/actif” d’origine végétale. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, 225p.

- Herzi N., 2013. Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, France, 193p.
- Hopkins G.W. et Evrard C.M., 2003. Physiologie végétale. De Boeck Université, 532 p.
- Institut National de la Recherche Forestière (INRF), 2012. Etat actuel des ressources génétiques forestières en Algérie. Disponible sur : <http://www.fao.org/documents>.
- Jacob M, Pellecuer J et Tomei R., 1979. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana. EPPOS*, 11, 26-30.
- Jaradat N. A., 2005. Ethnopharmacological Survey of Natural Products in Palestine. *An-Najah Univ. J. Res. (N. Sc.)*, Vol. 19.
- Jouad H., Haloui M., Rhiouani H., El Hilaly J. and Eddouks M., 2001. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 77, Issues 2-3, Pages 175-182.
- Kahouadji M.S., 1995. Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental. Thèse de troisième cycle. Université Mohammed I. faculté des sciences, Oujda. 206 p.
- Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. et Vergnes MF., 2008. Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *J Phytothérapie*. 6 :160-164.
- Knobloch K., Pauli P., Iberl B., Weigand H. and Weis N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1 , 603-608.
- Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M. and Mete E., 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99, 8788–8795.
- Lapie G. and Maige L. A., 1914. Flore forestière de l'Algérie. E. Orlhac, éditeur Librairie générale de l'Enseignement 1, rue Dante. Paris. 1 . 357 p.
- Lehouerou H.N., 1995. Bioclimatologie et biogéographie des steppes arides du nord de l'Afrique''. Option Méditerranéennes, série B, études et recherches, n° 10, 396 p.
- Loizzo M. R., Rosa T., Filomena C. A. M., Saab G. A. and Statti F. M., 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon. *Food Chemistry* 105: 572–578.

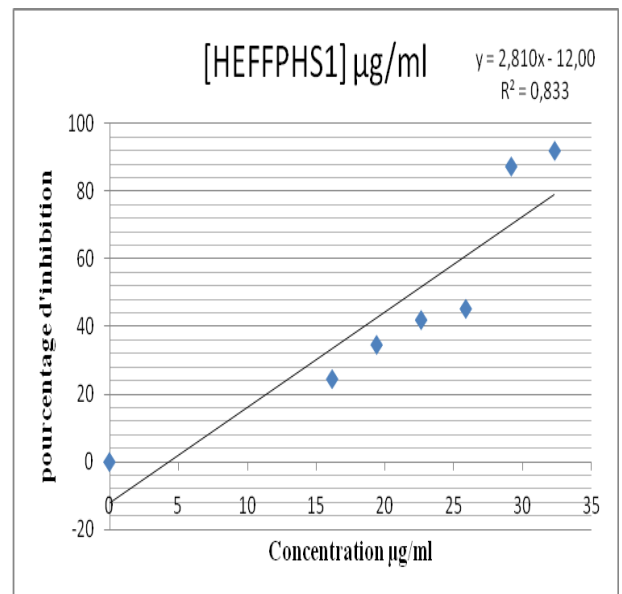
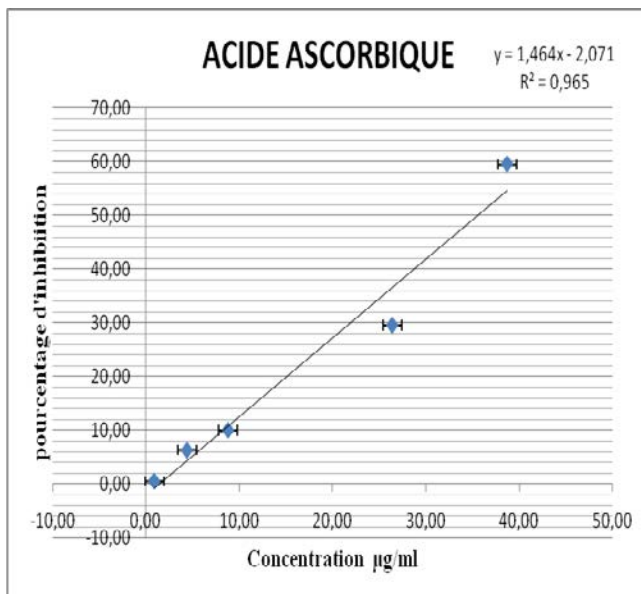
- Louni D., 1994. Les Forêts Algériennes. *Forêt méditerranéenne* XV(1):59–63.
- Mansouri N., Statrani B., Ghanmi M., El ghadraoui L., Aafi A. et Farah A., 2010. Valorisation des huiles essentielles de *Juniperus thurifera* et de *Juniperus oxycedrus* du Maroc. *Phytothérapie* 8: 166-70
- Massei G., Watkins R. and Hartley Susan E., 2006. Sex-related growth and secondary compounds in *Juniperus oxycedrus* macrocarpa. Elsevier, *Acta oecologica* 29: 135-140
- Mazari k., 2009. Etude phytochimique et pouvoir antimicrobien de *Juniperus phoenicea* L., *Juniperus oxycedrus* L., et *Cupressus sempervirens* L. de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère. Université Abou Bakr Belkaid. Algérie. 152 p.
- Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C. and Fernandez X., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 959-964.
- Mazliak P., 1974. *Physiologie végétale*. Vol. 1 : Nutrition et métabolisme. Vol. 2 : Croissance et développement. Hermann Paris éd.
- Meddour R., 2010. Bioclimatologie, phytogéographie et phytosociologie en Algérie exemple des groupements forestiers et préforestiers de la Kabylie Djurdjurèenne. Thèse de Doctorat, Université Tizi ouzou, Algérie, 461 p.
- Mellaoui-Murzeau F., 2013. Analyse de la politique du secteur forestier et des secteurs connexes Algérie. Direction Générale des Forêts (DGF), 78 p.
- Miara M. D., 2011. Contribution à l'étude de la végétation du massif de Guezoul (Tiaret). Mémoire de Magistère. Université es-sénia, Oran, Algérie, 167 p.
- Miguel M.G., 2010. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: Short Review. *Molecules*, 15(12), pp.9252–9287. Disponible sur: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/12/9252/>.
- Morrie C. A., Karchesy J., Blythe L., Gonzalez-Hernandez del Pilar M., and Swan Laurence R., 2004. Toxicity studies on western juniper oil (*Juniperus occidentalis*) and Port-Orford-cedar oil (*Chamaecyparis lawsoniana*) extracts utilizing local lymph node and acute dermal irritation assays. Elsevier, *Toxicology Letters* 154: 217–224
- Ngakegni-limbili A. C., 2012. Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

- Nichane M., 2015. Contribution à l'étude du dépérissement du Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) dans les monts des Traras Occidentaux (Wilaya de Tlemcen). Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen, Algérie, 247 p.
- Paris R. & Nothis A., 1969. Sur quelques plantes de la Nouvelle Calédonie - PL. Méd. & Phytorh.
- Perry M., 2013. Herboristerie : enquête sur les principales demandes à l'officine. Thèse de Doctorat en pharmacie Université de Lorraine. France. 151p.
- Pharmacopée Française (8^{ème} édition) 1965. Officialisation de la préparation du médicament homéopathique.
- Pichot C., El Maataoui M. 2000 – Anomalies de la reproduction et ressources génétiques chez *Cupressus dupreziana* A. Camus. Rec. Sem. Inter.: « Redécouvrir et réinventer une sylviculture en zones arides ». INRF – CRSTRA Djanet 2000 pp 90-97.
- Ponce AG., Fritz R., del Valle C. and Roura SI., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36: 679-684.
- Quézel P. et Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. éd. CNRS, Paris, vol. 1, 1-565.
- Quézel P., 1979. La région méditerranéenne française et ses essences forestières. Signification écologique dans le contexte circumméditerranéen. *Forêt médit*, pp. 7-18.
- Ramawat K. G. and Merillon J. M., 2013. Natural products, phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. Springer reference, 4135p.
- Ramdani M., Lograda T., Silini H., Zeraib A., Chalard P., Figueredo G., Bouchaala M. and Zerrar S., 2013. Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 022-028.
- Remmal A., Bouchikhit T., Rhayour K. and Ettaybi M., 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5, 179-184.
- Rezzi S., Cavaleiro C., Bighelli A., Salgueiro L., Da Cunha A. P. and Casanova J., 2001. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus Phoenicea* Subsp. *Turbinata* from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology* 29:179–88.
- Richard A., 2012. Synthèse bibliographique de la phytothérapie et de l'aromathérapie appliquées à la dermatologie. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, Université Claude-Bernard - Lyon I, 167 p.

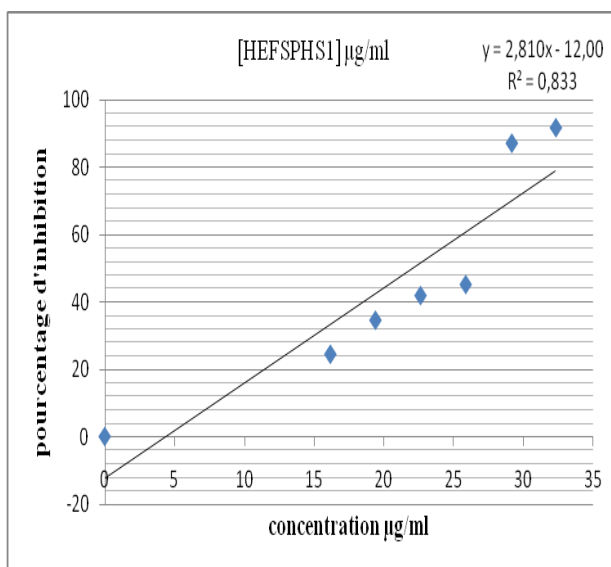
- Rusenova N. and Parvanov P., 2009. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 7, No. 1, pp 37-43.
- Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta, D. et Talbi M., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146: 88-89.
- Sayyed A. E., Bibi F. A. et Hassanzadeh-Khayyat M., 2011. Antioxidant activity of the essential oils of different parts of *Juniperus excelsa* M. Bieb. Subsp. *excelsa* and *J. excelsa* M. Bieb. subsp. *polycarpos* (K. Koch) Takhtajan (Cupressaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (4): 799-810.
- Sikkema J., De Bont J.A. M. and Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8022-8028.
- Société Française de Microbiologie (SFM), 2011. Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) – disponible sur : http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2011.pdf
- Stark T., Dorah M. and Onesmo B., 2013. Ethnopharmacological Survey of Plants Used in the Traditional Treatment of Gastrointestinal Pain, Inflammation and Diarrhea in Africa: Future Perspectives for Integration into Modern Medicine. disponible sur : (<http://www.mdpi.com/2076-2615/3/1/158/>).
- Thormar H., 2011. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. JohnWiley & Sons, Ltd. United Kingdom, 334p.
- Upadhyay R. K., Dwivedi P. and Ahmad S., 2010. Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils Against Pathogenic Bacterial Strains., 2(3), pp.152–158.

ANNEXES

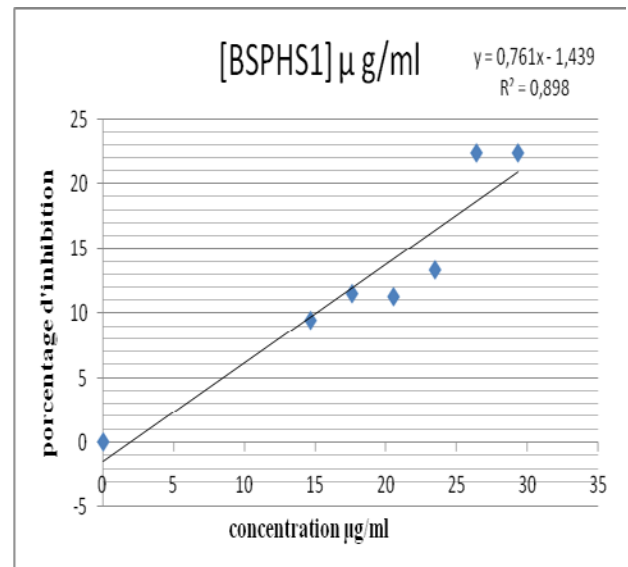
Annexe 01



HEFFPHS1: Huiles essentielles des feuilles fraîches de *J. phoenicea* site 1

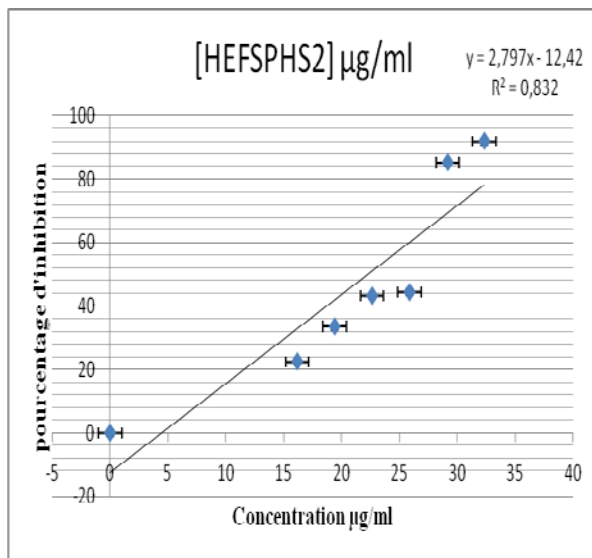


HEFSPHS1: Huiles essentielles des feuilles sèches de *J. phoenicea* site 1

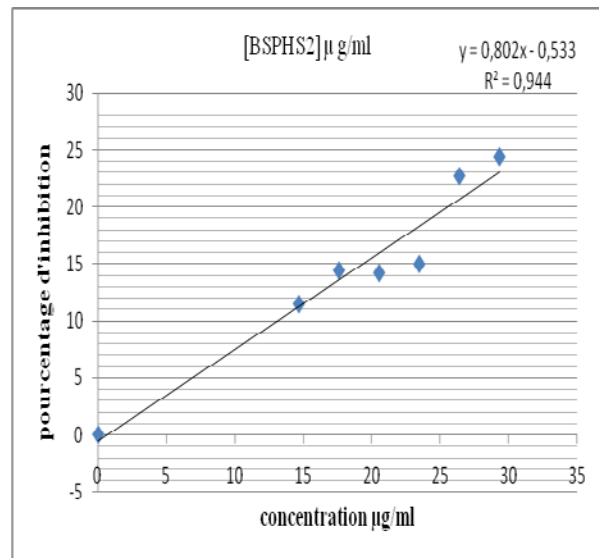


BSPHS1: Baies sèches de *J. phoenicea* site 1

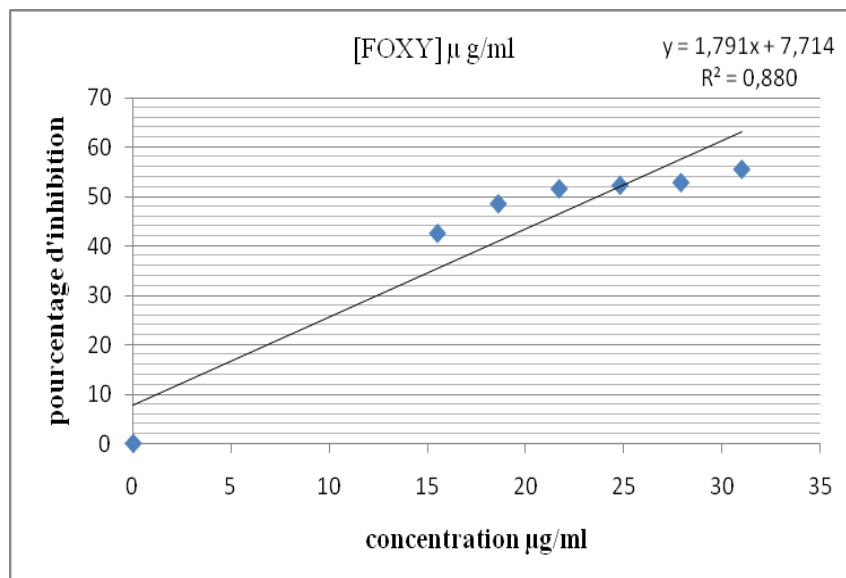
Annexe 02



HEFSPHS2: Huiles essentielles des feuilles sèches de *J. phoenicea* site 2



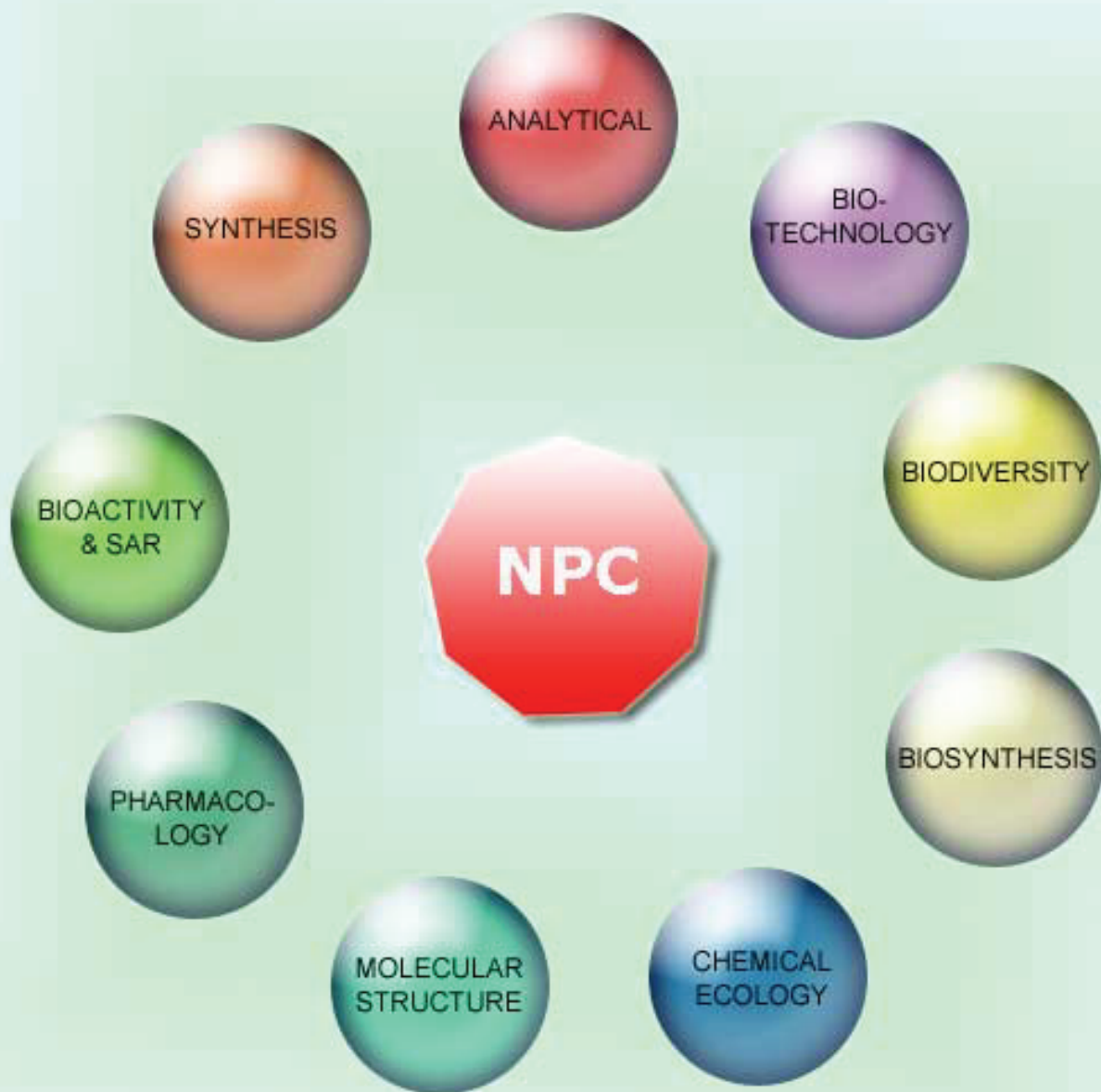
BSPHS2: Baies sèches de *J. phoenicea* site2



FOXY : Feuilles sèches de *J. oxycedrus*

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 11. Issue 4. Pages 431-568. 2016
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

EDITOR-IN-CHIEF**DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

EDITORS**PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry, University of Granada,
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain
afbarre@ugr.es

PROFESSOR MAUZIO BRUNO

Department STEBICEF,
University of Palermo, Viale delle Scienze,
Parco d'Orleans II - 90128 Palermo, Italy
maurizio.bruno@unipa.it

PROFESSOR DE-AN GUO

National Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology,
Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences,
Shanghai 201203, P. R. China
gda5958@163.com

PROFESSOR VLADIMIR I. KALININ

G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Pr. 100-letya Vladivostoka 159, 690022,
Vladivostok, Russian Federation
kalininv@piboc.dvo.ru

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI

School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE

Department of Chemistry, University of Wollongong,
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE

Department of Chemistry, Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER

Department of Chemistry, The University of Alabama in Huntsville,
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa 920-1181, Japan
y-tezuka@hokuriku-u.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON

Institute of Pharmaceutical Science
Faculty of Life Sciences & Medicine
King's College London, Britannia House
7 Trinity Street, London SE1 1DB, UK
david.thurston@kcl.ac.uk

HONORARY EDITOR**PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
axuf64@dsl.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Viqar Uddin Ahmad
Karachi, Pakistan

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Roberto G. S. Berlink
São Carlos, Brazil

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Maurizio Bruno
Palermo, Italy

Prof. Josep Coll
Barcelona, Spain

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Fatih Demirci
Eskişehir, Turkey

Prof. Francesco Epifano
Chieti Scalo, Italy

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Dr. Christopher Gray
Saint John, NB, Canada

Prof. Dominique Guillaume
Reims, France

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Hisahiro Hagiwara
Niigata, Japan

Prof. Judith Hohmann
Szeged, Hungary

Prof. Tsukasa Iwashina
Tsukuba, Japan

Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria

Prof. Phan Van Kiem
Hanoi, Vietnam

Prof. Niel A. Koorbanally
Durban, South Africa

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Gottingen, Germany

Prof. Marie Laccaille-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoei-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. Imre Mathe
Szeged, Hungary

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Luca Rastrelli
Fisciano, Italy

Prof. Stefano Serra
Milano, Italy

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Johannes van Staden
Scottsville, South Africa

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Ping-Jyun Sung
Pingtung, Taiwan

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2016 subscription price: US\$2,595 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,595 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,995 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

Antimicrobial Activity and Chemical Analysis of the Essential Oil of Algerian *Juniperus phoenicea*

Ahmed Bouyahyaoui^a, Fouad Bahri^a, Abderrahmane Romane^b, Martina Höferl^c, Juergen Wanner^d, Erich Schmidt^c and Leopold Jirovetz^c

^aLaboratory of Microbiology and Plant Biology, University of Abd El Hamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

^bLaboratory of Applied Chemistry, Faculty of Sciences Semlalia, Cadi Ayyad University, Marrakech, Morocco

^cDepartment of Clinical Pharmacy and Diagnostics, University of Vienna, Vienna, Austria

^dKurt Kitzing Co., Hinterm Alten Schloss, Wallerstein, Germany

romane@uca.ma

Received: November 23rd, 2015; Accepted: January 5th, 2016

The essential oils of *Juniperus phoenicea* L. from Algeria were obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-FID and GC-MS. Concerning their chemical composition, 74, 61 and 72 volatile compounds were identified from fresh leaves, dried leaves and berries, representing 88.8%, 91.3% and 94.7% of the total composition, respectively. The main monoterpene in the oils of fresh leaves, dried leaves and berries was α -pinene (29.6% / 55.9% / 56.6%), accompanied by lesser amounts of the sesquiterpenes β -caryophyllene (2.6% / 1.6% / 1.2%) and germacrene D (2.01% / 1.7% / 1.5%), respectively. Antibacterial activity of *J. phoenicea* essential oils was tested against one Gram-negative and four Gram-positive bacterial strains and the yeast *Candida albicans*, responsible for nosocomial infections. As references, 14 antibiotics and 5 antifungal agents were evaluated. The berry essential oil was ineffective against all but two of the strains tested, whereas the essential oil of dried leaves significantly inhibited all strains but *Pseudomonas aeruginosa*, which turned out to be the most resistant strain overall. However, *Escherichia coli* was the most susceptible to the essential oils tested. The essential oil of dry leaves was highly active against *Candida albicans*, outclassing even the standard antifungal substances. These promising results could substantiate the use of essential oils in the treatment of hospital-acquired infections.

Keywords: *Juniperus phoenicea*, Essential oil, α -Pinene, Antimicrobial, Antibacterial, Antifungal.

The treatment of nosocomial infections is usually based on the application of antimicrobials (antibiotics and antifungal agents). Continuous and inappropriate use of antimicrobial substances has caused the development of resistant strains. This resistance of microorganisms to antimicrobial drugs provokes problems in medicinal treatment [1]. New therapeutic concepts have to be found, including medicinal plants with a long-time traditional use. Empirical knowledge about therapeutic activities of medicinal plants and their extracts can lead to scientific research confirming the traditional indications [2]. Among natural antimicrobials essential oils (EOs) possess a wide spectrum of antibacterial [3], antifungal, antiparasitic [4] and insecticidal activities, along with other biological properties [5]. The antimicrobial activity of EOs depends on their specific chemical composition [6].

In Algeria, Cupressaceae (*Thuja* and *Juniperus*) represent the majority of forest formations, as well as semi-dry forest in mountainous areas. The common name of *Juniperus phoenicea* L. in Algeria is *Arar*, also known as *Ifz* or *Remba* in Tamazight. This species grows in arid and semi-arid highlands and in the Atlas Mountains in the Sahara desert on rock surfaces, steep slopes and caves in valleys from Djelfa to Saida. Phoenician juniper is also a typical juniper found throughout the Mediterranean region [7]. A combination of a wide geographical range and the presence of a wide spread of populations allows a species to generate a broad spectrum of genetic variability [8]. In fact, many authors have reported the presence of intraspecific taxa based upon morphological, biochemical and molecular data [8,9]. Recently, on the basis of Random Amplified Polymorphic DNAs fingerprinting, Adams *et al.* [10] distinguished between *J. phoenicea* var. *phoenicea* and *J. phoenicea* var. *turbinata* and affiliated populations.

J. phoenicea is considered an important medicinal plant, widely used in traditional medicine to treat diabetes, diarrhoea, and rheumatism, and as a diuretic [11,12]. The EOs of leaves and berries of *J. phoenicea* possess antimicrobial activity [13]. In the present study, the EOs of the fresh leaves, dried leaves and berries of *J. phoenicea* were analyzed for their chemical composition and antimicrobial activity.

The moisture content of the fresh leaves was determined to be 41.9%, compared with 32% for Moroccan samples [13]. The EO yields were 0.6%, 0.9% and 2.0% for *J. phoenicea* fresh leaves, dried leaves and berries, respectively. As expected, the EO yields of berries and dried leaves were higher than that of fresh leaves. Samples collected in the area of Marrakech showed similar results, 0.2% for fresh and 0.9% for dried leaves [14]. The difference in EO yield of fresh leaves may be due to the geographical distribution and genetic factors.

Table 1 summarizes the odour impressions of *J. phoenicea* EOs.

Table 1: Odour descriptions of the essential oils of fresh leaves, dried leaves and berries of *Juniperus phoenicea* from Algeria.

<i>J. phoenicea</i> fresh leaves	slightly fatty coniferous note, mild woody, softly blooming touch
<i>J. phoenicea</i> dried leaves	green-herbal note, slightly fatty leaf touch, woody, minty, dry tobacco
<i>J. phoenicea</i> berries	green, slightly oily note of juniper berry, herbal, dry peppery-woody connotation

Analyses of EOs from *J. phoenicea* demonstrate their richness in secondary metabolites. Results of the GC-FID and GC-MS of the EOs are given in Table 2. In total, 74, 61 and 72 volatile compounds could be identified from fresh leaves, dried leaves and berries, representing 88.8%, 91.3% and 94.7% of the total Eos, respectively.

Table 2: Composition (%) of the essential oils isolated from fresh leaves, dried leaves and berries of *Juniperus phoenicea* from Algeria determined by GC-FID and GC-MS.

N°	Compound	RI [#]	Fresh leaves	Dried leaves	Berries	N°	Compound	RI [#]	Fresh leaves	Dried leaves	Berries
1	Toluene	771	-	-	0.2	47	Z-Decen-1-ol	1261	1.6	0.6	0.3
2	Hexanal	800	-	-	0.1	48	cis-Chrysanthenyl acetate	1266	-	-	0.1
3	trans-2-Hexenal	852	-	-	0.1	49	Piperitone	1269	0.5	0.1	0.1
4	cis-3-Hexenol	854	0.1	-	0.2	50	Isopulegyl acetate	1284	0.8	0.6	0.3
5	Tricyclene	932	0.1	0.2	0.2	51	trans-Linalool oxide acetate	1292	-	0.2	0.1
6	α -Pinene	945	29.6	55.9	56.6	52	Linalool oxide acetate	1292	0.8	-	-
7	α -Fenchene	957	0.1	0.3	0.3	53	Bornyl acetate	1299	0.6	0.3	0.3
8	Camphene	960	0.2	0.4	0.5	54	2E,4E-Decadienol	1314	0.9	0.3	0.2
9	Thuja-2,4(10)-diene	964	0.1	0.2	0.2	55	2,4-Decadien-1-al	1323	0.1	-	-
10	Sabinene	982	0.1	0.1	0.1	56	Carvacrol methyl ether	1334	0.4	-	-
11	β -Pinene	988	0.5	0.8	1.0	57	Carvyl acetate	1344	0.2	0.1	-
12	Myrcene	993	0.7	1.8	2.0	58	δ -Elemene	1353	0.1	0.2	0.1
13	α -Phellandrene	1013	0.1	0.2	1.0	59	α -Terpinyl acetate	1361	2.7	1.2	0.6
14	δ -3-Carene	1020	0.5	2.3	0.9	60	α -Cubebene	1366	0.1	0.1	0.1
15	α -Terpinene	1025	0.1	0.1	0.1	61	Neryl acetate	1368	0.1	-	-
16	p-Cymene	1033	0.3	0.4	0.3	62	Geranyl acetate	1384	0.1	-	-
17	Limonene	1038	0.5	0.7	0.9	63	α -Copaene	1398	0.3	0.2	0.1
18	β -Phellandrene	1040	0.5	1.5	0.7	64	β -Elemene	1411	0.9	0.5	0.3
19	(E)- β -Ocimene	1050	-	0.1	0.1	65	β -Caryophyllene	1449	2.6	1.6	1.3
20	γ -Terpinene	1067	0.1	0.3	0.3	66	γ -Elemene	1453	0.4	0.2	0.1
21	trans-Linalool oxide	1081	0.2	-	-	67	Thujopsene	1463	0.5	0.4	0.1
22	Terpinolene	1098	0.4	0.5	0.6	68	α -Humulene	1483	1.1	0.7	0.6
23	Linalool	1103	2.2	0.7	0.5	69	7 α H, 10 δ H-Cadina-1(6),4-diene	1497	1.0	1.0	0.4
24	6-Camphenone	1108	-	-	0.1	70	Germacrene D	1509	2.1	1.7	1.5
25	α -Pinene oxide isomer1	1112	-	-	0.1	71	β -Selinene	1517	0.2	-	-
26	α -Pinene oxide isomer2	1137	0.5	0.2	0.6	72	γ -Amorphene	1522	2.5	1.6	0.8
27	trans-Pinocarveol	1156	0.8	0.1	1.1	73	Cubebol	1542	0.1	0.4	0.2
28	cis-Verbenol	1158	2.0	-	-	74	δ -Cadinene	1545	2.4	1.6	0.9
29	Camphor	1162	0.7	0.1	1.9	75	Calamenene	1547	1.0	0.4	0.2
30	Camphene hydrate	1166	-	-	0.1	76	Zonarene	1550	0.7	0.5	0.2
31	trans-Verbenol	1171	0.1	-	-	77	Elemol	1572	2.6	0.9	0.6
32	Pinocamphone	1176	0.2	-	-	78	Caryophyllene oxide	1619	1.3	0.5	0.4
33	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1178	0.5	0.1	1.6	79	Humulene epoxide II	1645	0.4	0.2	0.1
34	Borneol	1182	0.1	-	0.4	80	1- <i>epi</i> -Cubanol	1658	4.3	1.9	0.9
35	Isogeraniol	1188	-	-	0.1	81	t-Cadinol + t-Muurool	1670	1.4	0.5	0.3
36	Terpinen-4-ol	1191	0.9	0.2	1.1	82	Cubanol	1673	0.7	0.3	0.2
37	p-Cymen-8-ol	1194	-	-	0.3	83	α -Cadinol	1683	1.8	0.4	0.4
38	Cymen-8-ol	1195	0.6	-	-	84	Nonandecane	1901	0.2	-	-
39	Cryptone	1201	0.1	-	-	85	Eicosan	2001	0.4	-	0.6
40	α -Terpineol	1203	1.3	0.2	3.3	86	Abietal	2014	-	1.7	-
41	Myrtenol	1211	0.1	0.1	0.3	87	Manool oxide	2037	1.3	1.0	0.5
42	Myrtenal	1212	-	-	0.5	88	Abietadiene	2087	-	0.3	0.8
43	Verbenone	1226	0.9	0.1	1.9	89	Heneicosan	2100	0.4	-	0.8
44	trans-Carveol	1230	-	-	0.7						
45	Citronellol	1231	2.6	0.8	-						
46	Linalyl acetate	1257	-	0.6	0.3						
							Total identified		88.8	91.3	94.7

RI = retention index.

The EOs from this species are complex mixtures of monoterpenes, sesquiterpenes and their oxygenated derivatives. The main compound in *J. phoenicea* EOs of fresh leaves, dried leaves and berries, respectively, is the monoterpene hydrocarbon α -pinene (29.6% / 55.9% / 56.6%), accompanied by lesser amounts of the sesquiterpene hydrocarbons β -caryophyllene (2.6% / 1.6% / 1.2%) and germacrene D (2.01% / 1.7% / 1.5%). Our results could be confirmed by earlier studies. The composition of 50 samples of leaf oil of Algerian *J. phoenicea* var. *turbinata* L. harvested in eight locations was dominated by monoterpenes (α -pinene 30.2-76.7%) [15]. The EOs of Moroccan *J. phoenicea* [14] and of *J. phoenicea* var. *turbinata* from Spain and Portugal [13] are also rich in α -pinene (38.2%, 28.3% and 34.1%, respectively).

In Table 3, the activity of *J. phoenicea* Eos, as well as reference antibiotic and antifungal compounds against selected test strains is given. Critical diameters of antibiotic references were interpreted according to CA-SFM recommendations [16]. For EO samples, inhibition zone diameters <12 mm were regarded as intermediately active (bacteriostatic) and diameters \leq 18 mm as susceptible.

Regarding standard antibiotics, the strains tested generally exhibited susceptibilities similar to comparable test strains [17], with some

exceptions: Both EC and SA were resistant to doxycycline. Overall, PA was the most resistant strain, inhibited by only three antibiotics (gentamicin, colistin, norfloxacin), whereas SA was the most susceptible strain, regarding the number of inhibiting antibiotics (resistance against nalidixic acid, colistin and doxycycline), as well as extent of inhibition expressed by diameter of inhibition zone.

In the absence of any official standard as a reference for interpretation, the critical diameter for susceptibility of antifungal reference substances was subjectively set at \geq 17 mm for triazoles and \geq 15 mm for amphotericin B [17]. Strains were regarded as resistant at \leq 13 mm for triazoles and \leq 12 mm for amphotericin B. Amphotericin B, flucytosine and clotrimazole proved to be inactive, whereas CA was susceptible to econazole and miconazole.

Contrary to some of the antibacterial reference substances, none of the *J. phoenicea* EOs could inhibit the growth of PM to a significant extent; the EO of dried leaves showed an intermediate activity against PM, though its antibacterial activity against other test strains, especially SA, proved to be excellent.

The EO of *J. phoenicea* berries was ineffective against most of the test strains except for KP (intermediate activity) and EC. SA was

Table 3: Inhibition zones (diameters in mm) of *Juniperus phoenicea* essential oils and references substances according to the Vincent method (for essential oils) and CA-SFM method (for reference substances).

	EC	KP	PM	PA	SA	CA
<i>J. phoenicea</i> fresh leaves	25	19	12	18	16	18
<i>J. phoenicea</i> dried leaves	29	26	14	19	32	29
<i>J. phoenicea</i> berries	24	16	8	9	11	12
Cefazolin (30 µg)	21	23	12	0	31	-
Amoxicillin/clavulanic acid (20/10 µg)	27	30	20	0	31	-
Oxacillin (5 µg)	0	0	0	0	45	-
Neomycin (30 µg)	25	28	10	14	31	-
Gentamicin (30 µg)	32	39	22	32	40	-
Nalidixic acid (30 µg)	22	25	15	0	0	-
Chloramphenicol (30 µg)	30	30	22	15	30	-
Ampicillin (10 µg)	22	13	0	0	24	-
Sulfamethoxazole/tri-methoprim (1.25/23.75 µg)	0	25	20	0	29	-
Colistin (10 µg)	19	22	0	20	13	-
Norfloxacin (5 µg)	29	35	30	23	25	-
Pristinamycin (15 µg)	14	0	12	0	33	-
Erythromycin (15 µg)	14	15	0	0	36	-
Doxycycline (30 µg)	08	20	0	0	10	-
Amphotericin B (100 µg)	-	-	-	-	-	10
Econazole (50 µg)	-	-	-	-	-	18
Miconazole (50 µg)	-	-	-	-	-	19
Clotrimazole (50 µg)	-	-	-	-	-	10
Flucytosine (1 µg)	-	-	-	-	-	0

EC = *Escherichia coli*, KP = *Klebsiella pneumoniae*, PM = *Proteus mirabilis*, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, SA = *Staphylococcus aureus*, CA = *Candida albicans*

only moderately susceptible to the EO of fresh leaves. Overall, EC was the only strain susceptible to all three juniper EOs, whereas PM was the most resistant one. Regarding antifungal activity, the EO of dried leaves outclassed the standard antifungal substances by far, whereas the EO of fresh leaves showed similar activity to that of econazole and miconazole. The present results are comparable with other studies evaluating the antimicrobial activity of EOs of some sub-species of *J. phoenicea* [18].

Table 4: Minimum inhibitory concentrations (µg/mL) of *Juniperus phoenicea* essential oils determined by Direct Contact method

	EC	KP	PM	PA	SA	CA
<i>J. phoenicea</i> fresh leaves	276	552	2760	552	1380	552
<i>J. phoenicea</i> dried leaves	69	138	1380	552	27.6	69
<i>J. phoenicea</i> berries	276	1380	n.a.	n.a.	2760	2760

n.a. = not active; EC = *Escherichia coli*, KP = *Klebsiella pneumoniae*, PM = *Proteus mirabilis*, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, SA = *Staphylococcus aureus*, CA = *Candida albicans*

In Table 4, the minimum inhibitory concentrations (MICs) in µg/mL of EOs from fresh leaves, dried leaves and berries of *J. phoenicea* obtained by the Direct Contact method are shown. It could be demonstrated that the log MIC values strongly correlate with inhibition zone diameters. (Pearson $R = 0.9892$). Thus, the limits could be set at ≤ 2760 µg/mL for resistant and ≥ 552 µg/mL for susceptible strains. The EO of dried leaves showed by far the best activity against the test strains, especially against SA, EC and CA, but only intermediate results against PM, which was resistant to both EOs of fresh leaves and berries. Additionally, the EO of fresh leaves did not exhibit antibacterial activity against SA. Of all the strains tested, EC was the most susceptible to the EO of fresh leaves. Four out of 6 test strains proved to be resistant to EO of juniper berries. Moreover, KP was only moderately inhibited by the berry EO and EC the only test strain susceptible to the berry EO. To sum up, EC proved to be the only strain susceptible to all EOs tested in this study, whereas PM was the most resistant one.

No differences could be shown between the antimicrobial activity of fresh EOs and EOs stored at 4°C and light-protected for 6 months, thus confirming stability over time.

The antimicrobial activity of the EOs of *J. phoenicea* from Algeria could be associated with the amount of terpenes and their major constituents (e.g. α -pinene, myrcene, linalool), which exert their

activity [19,20] on microorganisms by attacking the plasma membrane, causing an increase in permeability and loss of cellular constituents [17,21]. Resistance of SA, PM and PA to the EOs of dried and fresh leaves and berries are related to their capacity to develop resistance to many antimicrobial agents from their frequent involvement in hospital infections. The results of this study compared with the EO of *J. phoenicea* from Morocco show a better antimicrobial activity [22].

Experimental

EO distillation and analysis: Fresh leaves and berries of *J. phoenicea* were collected from the Saharan Atlas Mountains (Morghrad Jebel in the Ain Sefra area of Naâma, South West Algeria), at an altitude of 1480 m in March 2011. The voucher specimen (BGPASNA13) was deposited in Abdelhamid University, Algeria. The leaves were air-dried at room temperature (ca. 22°C). The EOs were hydrodistilled for 3 h using a Clevenger apparatus. The obtained oils were stored under refrigeration until analyzed and tested.

GC-FID and GC-MS analyses were simultaneously performed on a Thermo Fisher Scientific Trace GC Ultra using a MS-FID splitter consisting of a quartz Y-splitter and a 20 cm \times 0.1 mm ID fused silica restrictor column as an inlet to the GC-MS interface and a 1 m \times 0.25 mm deactivated fused silica column serving as a transfer line to the FID detector. The split/splitless injector was heated at 230°C and connected to a 50 m \times 0.25 mm \times 1.0 µm SE-52 capillary column (made and tested for deactivation and separation efficiency in our lab [23]). The FID detector operated at 250°C. EO (0.1 µL) was injected with a 0.5 µL plunger-in-needle syringe at a split ratio of 1:100 using a TriPlus RSH Autosampler. For substance identification, a Thermo Fisher Scientific ISQ Mass Spectrometer was used with GC-MS interface heating at 250°C, ion source 230°C, EI mode at 70 eV, filament 50 µA, scan range 40–500 amu. The following temperature program was used: 60°C for 1 min, heating to 230°C at a rate of 3°C/min, 230° for 12.3 min. The carrier gas was helium 5.0 with a constant flow rate of 1.5 mL/min.

Thermo Xcalibur 2.2 software was used for identifying the compounds by correlating mass spectra to databases of NIST 08 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland), Wiley Registry of Mass Spectral Data 8th Edition (Wiley, Hoboken, New Jersey), Adams [24], MassFinder terpenoids library (Hochmuth, Hamburg, Germany) and our own library. Retention indices were determined according to [25,26]. Quantification was performed using normalized peak area calculations of the FID chromatogram without – by first approximation – relative FID response factors.

Antimicrobial activity: The antimicrobial activity of the EOs were tested against Gram-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, Gram-positive *Staphylococcus aureus*, and the yeast *Candida albicans*. These strains were obtained from the Microbiological Laboratory of the Hospital of Ain Tadless Mostaganem (Algeria) and were isolated from infected hospitalized patients. The strains were identified on API 20 E (Enterobacteriaceae) and API Staph (*Staphylococcus aureus*) plates. The sensitivity of the species was studied against 14 antibiotics and 5 antifungal agents given in Table 2 by the conventional CA-SFM method of susceptibility testing [16]. Inocula were prepared from liquid cultures incubated for 18 h, diluted with sterile saline solution to obtain approximately 10^8 cells/mL, at a density between 0.08 and 0.1 at 625 nm [27]. Mueller-Hinton medium was used for bacterial strains and Sabouraud + chloramphenicol medium for the yeast.

Antibiotic aromagrammes method (Vincent method): The method of susceptibility testing by diffusion from discs infused with pure EO was applied in order to test the antimicrobial activity [27]. One mL of each inoculum (10^8 cells/mL) was spread over plates containing Mueller Hinton Agar (MHA), and leftover inocula were removed by exhausting. Whatman paper discs (6 mm) impregnated with 6 μ L of the EO were placed on the media surface. The plates were left for 30 min at room temperature to allow the diffusion of the oil and afterwards incubated for 24 h at 37°C. Following incubation, the inhibition zone was measured. Control plates without EO were also included in the test. All experiments were run in triplicate.

Direct contact method: For determination of the MICs [27], the EOs were emulsified with a 0.2% agar solution in order to disperse the compounds and improve their contact with the test organisms and diluted with agar solution. Test tubes containing 13.5 mL of solid medium (MHA for bacteria and PDA for yeasts) were autoclaved for 20 min at 121°C, cooled to 45°C and added to 1.5 mL of each dilution to obtain final concentrations of 2760 to 13.8 μ g/mL. Test tubes were stirred properly before pouring into Petri dishes. References containing solely the culture medium agar solution were also tested.

References

- [1] World Health Organization. (2002) *Antimicrobial Resistance*. Fact sheet No. 194, reviewed March 2012
- [2] Debuigue G. (1984) *Larousse des Plantes qui Guérissent*. Librairie Larousse, Paris, 3.
- [3] Derwich E, Benziane Z, Boukir A. (2010) Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture and Biology*, **12**, 199–204.
- [4] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 446–475.
- [5] Batish DR, Singh HP, Kohli RK, Kaur S. (2008) Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, **256**, 2166–2174.
- [6] Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223–253.
- [7] Adams RP. (2004) *Junipers of the World: The Genus Juniperus*. Trafford Publishing, Vancouver.
- [8] Meloni M, Perini D, Filigheddu R, Binelli G. (2006) Genetic variation in five Mediterranean population of *Juniperus phoenicea* as revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Annals of Botany*, **97**, 299–304.
- [9] Adams RP, Pandey RN, Rezzi S, Casanova J. (2002) Geographic variation in the Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) of *Juniperus phoenicea*, *J. p. var. canariensis*, *J. p. subsp. eumediterranea*, and *J. p. var. turbinata*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**, 223–299.
- [10] Adams RP, Nguyen S, Achak N. (2006) Geographic variation in *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) from the Canary Islands, Morocco and Spain based on RAPDs analysis. *Phytologia*, **88**, 270–278.
- [11] Bellakhdar J. (1997). *La Pharmacopie Marocaine Traditionnelle*. Ibis Press, Paris, 272.
- [12] Benabid A. (2000) *Flore et Écosystème du Maroc*. Edition Ibis Press, Paris, 50.
- [13] Achak N, Romane A, Abbad A, Ennajar M, Romdhane M, Abderrabba A. (2008) Essential oil composition of *Juniperus phoenicea* from Morocco and Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **11**, 143–147.
- [14] Bahri F, Romane A, Arjouni Y, Harrak R, El Alaoui, El Fels A. (2011) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of Moroccan *Juniperus phoenicea*. *Natural Product Communications*, **6**, 1515–1518.
- [15] Bekhechi C, Atik Bekkera F, Consiglio D, Bighelli A, Tomi F, (2012) Chemical variability of the essential oil of *J. phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, **9**, 2742–2753.
- [16] Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (2011) *Recommandations 2011*.
- [17] Jacob M, Pellecuer J, Tomei R. (1979) Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana. EPPOS*, **11**, 26–30.
- [18] Bouzouita N, Kachouri F, Ben Halima M, Chaabouni M. (2008) Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, **10**, 119–125.
- [19] Mazari K, Bendimerad N, Bekhechi C, Fernandez X, (2010) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**, 959–964.
- [20] Ramdani M, Lograda T, Silini H, Zeraib A, Chalard P, Figueredo G, Bouchaala M, Zerrar S. (2013) Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **3**, 022–028
- [21] Knobloch K, Pauli P, Iberl B, Weigand H, Weis N. (1989) Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, **1**, 603–608.
- [22] Ait-Ouazzou A, Loran S, Arakrak A, Laglaoui A, Herrera A, Pagan R, Conchello P (2012) Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, **45**, 313–319.
- [23] Grob K. (1986) *Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography*, Dr. Alfred Huethig Verlag, Heidelberg.
- [24] Adams RP. (2001) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois.
- [25] Van Den Dool H, Kratz PD. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **11**, 463–471.
- [26] National Institute of Standards and Technology. *Gas Chromatographic Retention Data*. <http://webbook.nist.gov/chemistry/gc-ri/> (retrieved 2013-04-15)
- [27] Remmal A, Bouchikhit T, Rhayour K, Ettaybi M. (1993) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, **5**, 179–184.

The Effect of Camellia Seed Oil Intake on Lipid Metabolism in Mice Tadaaki Satou, Naoko Sato, Haruyo Kato, Mana Kawamura, Sanae Watanabe and Kazuo Koike	511
Essential Oil Compositions and Antimicrobial Activities of Various Parts of <i>Litsea cubeba</i> from Taiwan Yu-Chang Su and Chen-Lung Ho	515
Antimicrobial Activity and Chemical Analysis of the Essential Oil of Algerian <i>Juniperus phoenicea</i> Ahmed Bouyahyaoui, Fouad Bahri, Abderrahmane Romane, Martina Höferl, Juergen Wanner, Erich Schmidt and Leopold Jirovetz	519
Antifungal Screening of Lavender Essential oils and Essential Oil Constituents on three Post-harvest Fungal Pathogens Lauren AE Erland, Christopher R Bitcon, Ashley D Lemke and Soheil S Mahmoud	523
Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oils of <i>Heracleum pyrenaicum</i> subsp. <i>pollinianum</i> and <i>Heracleum orphanidis</i> Ljuboš Ušjak, Silvana Petrović, Milica Drobac, Marina Soković, Tatjana Stanojković, Ana Ćirić and Marjan Niketić	529
Composition and Biological Activity of Volatile Oil from <i>Salvia judaica</i> and <i>S. multicaulis</i> from Jordan Fatma U. Afifi, Violet Kasabri, Hala I. Al-Jaber, Barakat E. Abu-Irmaileh, Mahmoud A. Al-Qudah and Ismail F. Abaza	535
Anti-adipocyte Differentiation Activity and Chemical Composition of Essential Oil from <i>Artemisia annua</i> Dae Il Hwang, Kyung-Jong Won, Do-Yoon Kim, Seok Won Yoon, Joo-Hoon Park, Bokyung Kim and Hwan Myung Lee	539
Essential Oil Chemical Composition and Headspace Volatiles Profile of <i>Achillea coarctata</i> from Serbia Ivana R. Kostevski, Goran M. Petrović, Gordana S. Stojanović, Jelena G. Stamenković and Bojan K. Zlatković	543
Preisocalamendiol, Shyobunol and Related Oxygenated Sesquiterpenes from Bolivian <i>Schinus molle</i> Essential Oil Alexis St-Gelais, Michel Mathieu, Virginie Levasseur, Jesús Flores Ovando, Ruben Escamilla and Hubert Marceau	547
Comparative Chemical Analysis of <i>Mentha piperita</i> and <i>M. spicata</i> and a Fast Assessment of Commercial Peppermint Teas Mihaela Buleandra, Eliza Oprea, Dana Elena Popa, Iulia Gabriela David, Zenovia Moldovan, Iuliana Mihai and Irinel Adriana Badea	551

Accounts/Reviews

Antiherpetic Plants: A Review of Active Extracts, Isolated Compounds, and Bioassays David Silva-Mares, Ernesto Torres-López and Verónica M. Rivas-Galindo	557
---	-----

Natural Product Communications

2016

Volume 11, Number 4

Contents

Original Paper

The Terpenoid Biosynthesis Toolkit of <i>Trichoderma</i> Ravindra Bansal and Prasun Kumar Mukherjee	431
Anti-angiogenic Activity and Mechanism of Sesquiterpene Lactones from <i>Centipeda minima</i> Weihuan Huang, Xiaobin Yu, Ning Liang, Wei Ge, Hin Fai Kwok, Clara Bik-San Lau, Yaolan Li and Hau Yin Chung	435
Bis-sesquiterpene from the Marine Sponge <i>Dysidea fragilis</i> Phan Van Kiem, Nguyen Xuan Nhiem, Bui Huu Tai, Hoang Le Tuan Anh, Dan Thi Thuy Hang, Nguyen Thi Cuc, Le Thi Huyen, Nguyen Hoai Nam, Pham Hai Yen, Do Cong Thung and Chau Van Minh	439
Two New Compounds from the Leaves of <i>Glochidion obliquum</i> Vu Kim Thu, Nguyen Van Thang, Nguyen Xuan Nhiem, Hoang Le Tuan Anh, Pham Hai Yen, Dan Thi Thuy Hang, Chau Van Minh and Phan Van Kiem	443
A Norsesesterterpene Peroxide from a Marine Sponge <i>Hippospongia</i> sp. Ching-Chyuan Su, Huey-Jen Su, Kai-Ju Liang, Su-June Tsai and Jui-Hsin Su	445
A Novel Tirucallane-type Triterpene and Sesquiterpene from <i>Trichilia maynassiana</i> Massimiliano D'Ambola, Nicola Malafronte, Maria Gualtieri, Vanessa Hernández, Antonio Vassallo and Lorella Severino	447
Stereospecific Oxidation of Diacetoxysterobetulin with Ozone and Dimethyldioxirane El'mira F. Khusnutdinova, Natalya I. Medvedeva, Dmitri V. Kazakov, Olga S. Kukovinets, Alexander N. Lobov, Kirill Yu. Suponitsky and Oxana B. Kazakova	449
Effectiveness of 5-Pyrrolidone-2-carboxylic Acid and Copper Sulfate Pentahydrate Association against Drug Resistant <i>Staphylococcus</i> Strains Paolo Governa, Elisabetta Miraldi, Gianna De Fina and Marco Biagi	453
Effect of Selected Pyrazine Derivatives on the Production of Phenolics and Rutin in <i>Urtica dioica</i> and <i>Fagopyrum esculentum</i> Šárka Moravcová, Vendula Fiedlerová, Jiří Tůma, Karel Musil and Lenka Tůmová	457
A New Diketopiperazine, Cyclo(D-<i>trans</i>-Hyp-L-Leu) from a Kenyan Bacterium <i>Bacillus licheniformis</i> LB 8C^T Seoung Rak Lee, Christine Beemelmanns, Leah M. M Tsuma, Jon Clardy, Shugeng Cao and Ki Hyun Kim	461
Aerobic Decomposition of Trialkylquercetins: Structure Characterization and Antiproliferative Effect Sami M.R. Al-Jabban, Xiaojie Zhang, Guanglin Chen, Liva Harinantenaina Rakotondraibe and Qiao-Hong Chen	465
Evaluation of Radical Scavenging Activity of <i>Sempervivum tectorum</i> and <i>Corylus avellana</i> Extracts with Different Phenolic Composition Ágnes Alberti, Eszter Riethmüller, Szabolcs Béni and Ágnes Kéry	469
Chemical Constituents from the Roots, Stems and Leaves of <i>Diplomorpha sikokiana</i> Hari Prasad Devkota, Khem Raj Joshi, Takashi Watanabe and Shoji Yahara	475
Two New Phenanthrene Glucosides from <i>Cremastra appendiculata</i> and their Cytotoxic Activities Xin-Qiao Liu, Xiao-Ping Li, Wen-Ke Yuan, Qiao-Yu Yuan and Bin-Hua Qin	477
Two New Anthraquinones from the Roots of <i>Prismatomeris connata</i> Chun-Xiang Wang, Sa-Na Zhao, Shi-Xiu Feng, Xiao-Ping Zhang and Tao Chen	481
HPLC-Guided Isolation, Purification and Characterization of Phenylpropanoid and Phenolic Constituents of Nutmeg Kernel (<i>Myristica fragrans</i>) Sharon Chiu, Thomas Wang, Martin Belski, and Ehab A. Abourashed	483
Two New Compounds from <i>Artemisia sacrorum</i> Qinghu Wang, Rongjun Wu, Narenchaoketu Han, Nayintai Dai and Jiesi Wu	489
Antiproliferative Properties of Oleuropein in Human Osteosarcoma Cells Jose M. Moran, Olga Leal-Hernandez, Maria L. Canal-Macias, Raul Roncero-Martin, Rafael Guerrero-Bonmatty, Ignacio Aliaga and Juan D. Pedrera Zamorano	491
Activity of the Lichen <i>Usnea steineri</i> and its Major Metabolites against Gram-positive, Multidrug-resistant Bacteria Marcos G. Tozatti, Daniele S. Ferreira, Lúcio G. Bocalon Flauzino, Thaís da Silva Moraes, Carlos H. G. Martins, Milton Groppo, Márcio L. Andrade e Silva, Ana H. Januário, Patricia M. Pauletti and Wilson R. Cunha	493
A New Succinate Derivative from <i>Ajuga decumbens</i> Gai-Xia Fan, De-Juan Zhi, Hui Ren, Zheng-Yu Li, Qiao-Ling Hu, Ying-Hong Liu, Zhan-Xin Zhang and Dong-Qing Fei	497
Chlorogenic Acid Interaction with Cisplatin and Oxaliplatin: Studies in Cervical Carcinoma Cells Daniela Catanzaro, Raffaella Filippini, Caterina Vianello, Maria Carrara, Eugenio Ragazzi and Monica Montopoli	499
In Vitro and In Vivo Antiangiogenic Activity of Crowberry (<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>japonicum</i>) Hong-Sook Bae, Hyun Ju Kim, Da Hye Jeong, Takahiro Hosoya, Shigenori Kumazawa, Mira Jun, Oh-Yoen Kim, Sun Wook Kim and Mok-Ryeon Ahn	503
Search for β-Secretase Inhibitors from Natural Spices Shinichi Matsumura, Kazuya Murata, Yuri Yoshioka and Hideaki Matsuda	507

Continued inside backcover

المخلص

ان استخلاص الزيوت الطيارة بطريقة التقطير المائي من أوراق و ثمار العرعر الفينيقي *Juniperus phœnicea* L. و أوراق العرعر الشرييني *Juniperus oxycedrus* L. المتواجد بجبال الاطلس الصحراوي ، اعطت معدلات المردود التالية (الأوراق 0,6 – 0,9 %، الثمار: 2 – 2,5 % و الأوراق: 0,1 %) على الترتيب. كما مكنت التحاليل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة CG-SM من التعرف على معظم ال مركبات العضوية المتطايرة لهذه الزيوت. إلا ان التربينات الاحادية الاساسية تمثلت في الفا- بينان، بالإضافة الى كميات قليلة من السيسكويتربينات مثل دلتا- جيرماكران و بيتا- كريفيلان. ان زيوت اوراق *J. phœnicea* بدت جد فعالة من زيوت الثمار و زيوت اوراق *J. oxycedrus* ؛ حيث تراوحت التراكيز المثبطة الدنيا MIC بين 13.8 و 1380 مكغ/مل و هذا ضد معظم السلالات المختبرة و المسؤولة عن عدوى المستشفيات (*Pseudomonas aeruginosa* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Escherichia coli* ، *Proteus mirabilis* ، *Staphylococcus aureus* ، *Candida albicans*). و لقد اظهرت زيوت اوراق *J. phœnicea* و *J. oxycedrus* نفس النشاط ضد الأكسدة حيث قدرت قيمة معدل التركيز الفعال المانع للأكسدة بنسبة 50% (EC50) بـ: $22,51 \pm 0,74$ مكغ/مل، بينما قدر بـ: $35,57 \pm 2,47$ مكغ/مل لفيتامين ج و بـ: $65,30 \pm 3,24$ مكغ/مل لزيوت ثمار *J. phœnicea*. الكلمات المفتاحية: العرعر الفينيقي، العرعر الشرييني، الاطلس الصحراوي، الزيوت الطيارة، النشاط ضد الميكروبي، النشاط ضد الاكسدة.

Abstract

The extraction of essential oils from the fruits of the *Juniperus phœnicea* L. as well as from the dry leaves of *Juniperus oxycedrus* L., available in the Saharan Atlas, yield the following rates (leaves: 0,6 – 0,9 %, berries: 2 – 2,5 % and leaves: 0,1 %) respectively. Then again, the analysis of these oils by GC-FID and GC-MS enabled the identification of the major volatile organic compounds existing in these leaves and fruits. However, the major monoterpene in these oils was the α -pinene accompanied by lesser amounts of the sesquiterpenes as β -caryophyllene and germacrene D. The *J. phœnicea* leaf oils have proved more effective vis-a-vis the berries and leaves of *J. oxycedrus*. The results showed a significant antimicrobial effect against the majority of the tested strains responsible for nosocomial infections (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) with MIC (minimum inhibitory concentrations) ranging from 13,8 to 1380 μ g/ml. Moreover, the antioxidant activity of all essential oils' leaves of *J. phœnicea* and of *J. oxycedrus* have shown an identical reaction, estimated to 50 % EC50 (effective concentration) of $22,51 \pm 0,74$ μ g/ml; while the EC50 of vitamin C was assessed to $(35,57 \pm 2,47$ μ g/ml) and that of essential oils of berries of *J. phœnicea* was evaluated at $65,30 \pm 3,24$ μ g/ml.

Keywords: *Juniperus phœnicea*, *Juniperus oxycedrus*, Saharan Atlas, essential oils, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Résumé

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation à partir des feuilles et baies sèches de *Juniperus phœnicea* L., ainsi que celles des feuilles sèches de *Juniperus oxycedrus* L. se trouvant dans les monts de l'atlas saharien, ont donné des rendements moyens de (feuilles: 0,6 – 0,9 %, baies: 2 – 2,5 % et feuilles: 0,1 %) respectivement. L'analyse de ces huiles par CG-SM a permis l'identification de la majorité des composés volatils de ces huiles essentielles. Cependant, le monoterpène majoritaire dans ces huiles a été l' α -pinene, accompagné par de faibles quantités de sesquiterpènes comme le β -caryophyllène et le germacrène D. En outre, les huiles essentielles des feuilles de *J. phœnicea* se sont montrées plus actives que celles des baies et des feuilles de *J. oxycedrus* avec des CMI (concentrations minimales inhibitrices) de 13,8 à 1380 μ g/ml contre la majorité des souches testées responsables des infections nosocomiales (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*). De plus, l'activité antioxydante de toutes les huiles essentielle des feuilles de *J. phœnicea* et *J. oxycedrus* ont montré le même effet à la CE50 (concentration efficace à 50) moyenne de $22,51 \pm 0,74$ μ g/ml ; tandis que la CE50 de la vitamine C a été estimée à $(35,57 \pm 2,47$ μ g/ml), alors que celle des baies de *J. phœnicea* a été évaluée à $65,30 \pm 3,24$ μ g/ml.

Mots-clés: *Juniperus phœnicea*, *Juniperus oxycedrus*, Atlas Saharien, huiles essentielles, activité antimicrobienne, activité antioxydante.