

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université A.
MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Ecologie microbienne



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude comparative de l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire des huiles essentielles des parties aériennes de *Pinus nigra*

Présenté par :

Hamitouche karima & Meziani safia

Soutenu le : 26/06/2023

Devant le jury composé de :

Mme. FARADJI S.	MCA	Présidente
Mme. BENSIDHOUM L.	MCB	Promotrice
Mr. NABTI El-H.	Professeur	Examineur

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Avant tous, nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la sante, la volante, le courage et la force pour mener à terme ce travail.

*Nous tenons à remercier vivement notre chère promotrice Mme **BENSIDHOUM LEILA**, pour avoir proposé le thème et pour avoir accepté d'être notre promotrice. Nous la remercions pour la qualité exceptionnelle de son encadrement, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation.*

*Notre remerciement s'adresse également à la présidente de jury Mme. **FARADJI S.** Vous nous faites l'immense honneur de siéger au sein de jury de notre soutenance, nous vous remercions infiniment pour l'intérêt que vous portez à notre travail.*

*Notre remerciement s'adresse également à notre examinateur Mr. **NABTI EL-H**, Nos vifs remerciements vont à vous pour l'immense honneur que vous nous faite en acceptant d'examiner notre travail. Nous tenons aussi à vous remercier pour nous avoir accordé la chance de travailler au sein de votre Laboratoire.*

*Nos vif remerciement vont a Mr **ADJAOUD A.** pour nous avoir fournit les huiles essentielles ainsi que pour son aide précieuse*

*Nos remerciements s'adressent également à Mme **Fatima mkn** et **Abdoune Ahlame** , pour leurs aide très précieuse , leurs gentillesse, leurs précieux conseils, et leurs présence permanente à nos côté durant toute la réalisation de notre travail, qu'il trouve dans ces pages, l'expression de notre grand respect et notre gratitude.*

*Nous remercions aussi Mr. **Zaghib Walid** pour son aide et ses conseils*

Nos remerciements vont également, à l'ensemble du personnel technique de Biomasse et Environnement du Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables et l'équipe du laboratoire Mycologie .

Nous remercions ainsi nos familles qui nous ont toujours soutenues, et qui sont la lumière de notre vie, qui ne soit jamais éclaircit sans elles.

Enfin, une profonde reconnaissance à tous ceux qui ont collaborés de près ou de loin à la réalisation de ce travail , nous les remercions tous, très chaleureusement

Dédicaces

Au nom de mon Dieu tout-puissant, je dédie avec un amour profond et une immense fierté ce travail à mes êtres les plus chers.

A mes très chers parents

*Je dédie ce travail à mon père **Zoubir**, et à ma mère, **Saloua** Hamdouni, qui ont consacré leur vie à construire la mienne. Ils ont toujours été présents pour partager mes joies et mes peines. Je souhaite exprimer tout mon amour, mon affection et mon profond respect à leur égard. J'espère que par le biais de ce modeste travail, je pourrai vous rendre un peu de la fierté que je ressens d'être votre fille. Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie remplie de santé et de joie.*

A mes chères sœurs et frères

*A mon ange gardien, ma chère soeur **Tayri** je suis profondément reconnaissant(e) pour votre amour inconditionnel. Votre présence dans ma vie est un précieux cadeau. Je vous remercie du fond du cœur d'être là pour moi toujours, de m'écouter, de me comprendre et de me soutenir dans tous les aspects de ma vie.*

*A mes très chers frères **Said et Rayane**, mes chères sœurs **Yasmine, Asia, Dounia** et son mari **Hani djelouah**, nos petits ange "Aylène", "Ilan". Je vous souhaite un meilleur avenir plein de bonheur et joie, de la chance, réussite et du succès, Que vos rêves deviennent un si jour une réalité. Et dieu vous protèges toujours.*

A mon oncle Mr Boukhalifa Farid et à mes tentes Hamdouni .Nabila et Samia, Soriya Kaid merci pour votre soutien et encouragement et vos conseils que vous m'avez apporté que dieu vous protège et protège vos êtres chers.

A mes cousins Amine, Hakim, Hachimi Sedik, Kaid, Walid redjal, Lyes ait Abdelmalek,

A la mémoire de mes grands parents, mon oncle Moustafa.M, mon petit neveu ILAN.

A mes amies Wissam aouchiche et Samira timedrari, Thiziri, Sonia, Roza, Djiji, Belinda, Chahinez, Lynda, Chahla, Dyhia, Wahiba, Nouzha, Nadia, Meziani Nassim, ainsi tous mes amis que je n'ai pas pu citer, ce fut un bonheur de passer les dernières années avec vous des souvenirs graver dans la mémoire. Merci encore pour tout l'amour, la joie et le bonheur que vous apportez dans ma vie. Je suis bénie de vous avoir connu.

A les binomes Karima, Hamida, Katia, Chahinez, Wissam.

A tous mes enseignants durant mon parcours étude

A tous ceux qui me connaissent de près ou de loin et a tout la promo de 2023 SNV.

Safia

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, pour exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance, que vous méritez. Je dédie ce modeste travail

A mes parents

La femme la plus forte et la plus courageuse au monde et qui m'a toujours soutenu et encouragé afin arriver la aujourd'hui, ma très chère mère les mots ne sont pas assez forts pour exprimer toute la gratitude et l'estime que je te dois.

A La mémoire de mon père, qui est toujours présent dans mon cœur et mes pensées, qui seraient sans doute fier de sa fille et du chemin qu'elle a parcouru. J'aurais bien voulu que vous soyez parmi nous en ce jour, Reposez en paix cher père, que Dieu ait ton âme et l'accueille en son vaste paradis.

A ma grande sœur et sa petite famille

L'YNA et son mari LAZIZ ainsi leurs enfants DJIDA, AYOUB, TAOUS mes petits anges. la petite famille qui m'a toujours soutenus et encouragés.

A ma petite sœur

LYDIA malgré son jeune âge elle m'a toujours donné le soutien et le courage dans tous les moments les plus difficiles et surtout les plus beaux moments durant cette période.

A Mes deux frères

MOURAD et YANIS, qui m'en soutenu dans chaque pas que je fais vous êtes toujours avec moi.

Ma chère famille Vous êtes mes alliés, mes confidents, l'épaule sur lequel je m'appuyer, Merci d'être ce que vous êtes pour moi. Je vous aime.

A FOUAD qui a toujours été avec moi dans les hauts et les bas.

A ma promotrice madame Bensidhoum Liela qui a été toujours présente avec nous. je tiens à vous remercier pour votre aide vous conseilles dans tous les domaines et sur tout pour votre générosité.

A Fatima Mokrane (faty). Merci infiniment pour votre présence vous conseils et surtout votre temps que vous avez partagé avec nous.

A Mm Bouaoud Yousra. Je tiens à vous remercier pour vous conseils et votre soutien

A ma binôme, et les binômes de madames Bensidhoum Merci pour tout.

A dada Nacer et Lyes. A tous mes enseignants, et toutes personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.

Karima

Liste des figures

Figure 1 :Structures histologiques de quelques appareils sécréteurs.....	4
Figure 2 : Principe de la vapo-distillation des huiles essentielles	7
Figure 3 : Appareil Clevenger pour l'hydrodistillation	8
Figure 4 : Extraction des huiles essentielles des différentes parties de <i>P. nigra</i> par hydrodistillation	15
Figure 5 : Préparation de la suspension bactérienne	16
Figure 6 : Activité antibactérienne des HE par la méthode de micro-atmosphère.....	18
Figure 7 : Teste de détermination de la CMI sur microplaque.....	19
Figure 8 : Préparation de la suspension sporale	20
Figure 9 : Activité antifongique des HE par la méthode de micro-atmosphère	21
Figure 10 : Les différentes étapes suivies dans le test <i>exvivo</i> sur pommes de terre	23
Figure 11 : Activité de DMSO et des Antibiotiques sur les souches bactérienne	24
Figure 12 : Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>P. nigra</i>	25
Figure 13 : Diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur les souches bactériennes sous l'action des huiles essentielles de <i>P. nigra</i>	25
Figure 14 : Résultats de l'activité antibactérienne des différents mélanges des HE de pinus nigra.....	27
Figure 15 : Diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur la souche Ds sous l'action des différents mélanges des HE de <i>P. nigra</i>	27
Figure 16 : Diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur les souches Dd et Pcc sous l'action des différents mélanges des HE de <i>P. nigra</i>	29
Figure 17 : Activité antifongique des HE sur les champignons	33
Figure 18 : Diamètres moyens des zones d'inhibition des champignons par les différentes huiles	33

Figure 19 : Activité antifongique des HE sur <i>A. niger</i>	34
Figure 20 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne par les extraits purs de <i>P.nigra</i> par la méthode micro-atmosphère	34
Figure 21 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique par l'huile essentielle d' <i>P. nigra</i> et de diclofénac sodique	36
Figure 22 : Les valeurs des surfaces de lyse obtenues sur des pommes de terre infectées par <i>D. solani</i> et traité par des huiles de <i>P. nigra</i>	38
Figure 23 : Aspect des surfaces de lyse obtenues sur des pommes de terre infectées par <i>D. solani</i> et traité par des huiles de <i>P. nigra</i>	38

Liste des tableaux

Tableau I : Composition chimique des HE et leurs différentes propriétés et toxicité 5

Tableau II : Les souches bactériennes et fongiques utilisées 14

Tableau III : Degrés de sensibilité des souches Ds, Dd et Pcc aux HE testées 26

Tableau IV : Nature de l'activité des huiles essentielles pures et leurs dilutions 29

Tableau V : Concentration minimale inhibitrice des trois deux HE en mg/ml 32

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de la variance

BN: Bouillon Nutritif

CMB: Concentration Minimal Bactéricide

CMI: Concentration Minimal Inhibitrice

DMSO : DiméthylSulfOxyde

HE : Huile Essentielle

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

LSD: Différence la Moins Significative

MH:Gélose de Mueller Hinton

PCA: Gélose pour Dénombrement

PDA : Gélose Dextrosée a la Pomme de terre

PGI% : Pourcentage d'Inhibition de la Croissance

SM : Solution Mère

TSA: Gélose Tryptone Soja

Glossaire

- **Antalgique** : Substances antidouleurs, ou analgésiques elles ont pour rôle de diminuer la douleur.
- **Antialergique** : Substances s'opposant à une réaction allergique de l'organisme vis-à-vis d'un agent étranger.
- **Antiparasitaire** : Substances qui contribue a neutraliser les parasites et les vers.
- **Antiseptique** : Substances qui détruit ou prévient le développement des agents infectieux sur la peau ou les muqueuses.
- **Antispasmodique** : substances vise a éliminé les douleurs abdominales.
- **Calmant** : Substances ayant la capacité a exercer une action sédatrice sur la douleur.
- **Cholérétiques** : substances à prendre lors de l'insuffisance biliaire. Elles favorisent la production des bile par le foie.
- **Cicatrisant** : Substances qui contribue a la réparation des lésions des tissus et des organes.
- **Cortison-like** : composées de molécules pouvant mimer l'action de la cortisone dans l'organisme.
- **Décongestionnant** : substances servent à traiter la congestion de la muqueuse nasale provoquée par une infection ou par une allergie dans les cas de : rhume, rhinite ou de sinusite.
- **Dermocaustiques** : Substances qui agissent par l'irritation cutanée, et dont le contact peut entraîner des brûlures de la peau et des muqueuses.
- **Expectants balsamique** : Substance qui servent a calmer les inflammations des muqueuses, notamment celles des voies respiratoires.
- **Expectorant** : substances qui augmentent l'expulsion du mucus de la trachée ou des bronches par de l'expectoration ou de la toux.
- **Hypertenseurs** : Substances qui contribuent à augmenter la pression artérielle dans le réseau vasculaire artériel.
- **Hypotenseurs** : Substances qui contribuent à abaisser la tension artérielle.
- **Immunostimulant** : substances qui stimule les défenses immunitaires.
- **Lymphotonique** : Substances qui permettent d'améliorer la circulation lymphatique et la réponse immunitaire.

- **Mucolytiques** : Substances qui permettent de fluidifier le mucus et favoriser son élimination.
- **Neurotonique** : substances qui vise à rétablir le tonus, la vitalité et l'équilibre des nerfs afin de soulager certaines affections nerveuses.
- **Positivant et négativant** : substances électroniques ayant la capacité a donner un électron (positivant) ou a prend un électron (négativant).
- **Rééquilibrant nerveux** : Substances ayant une action régulatrice des équilibres nerveux, sanguin et métabolique.
- **Sédatifs** : Substance qui a une action dépressive sur le système nerveux central et qui entraîne un apaisement, une relaxation, une réduction de l'anxiété, une somnolence, un ralentissement de la respiration et une diminution des réflexes.
- **Stimulant** : substances qui servent à augmenter l'activité du système nerveux en facilitant ou améliorant certaines fonctions de l'organisme.
- **Tonique** : substances servent à nettoyer, purifier, rafraîchir et tonifier la peau. Elles sont utilisées pour enlevant les impuretés résiduelles.

Remerciement

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Glossaire

Sommaire

Introduction 1

Partie bibliographique

I. Généralité sur les huiles essentielles..... 3

I.1. Définition 3

I.2. Historique..... 3

I.3. Répartition et localisation des huiles essentielles 4

II. Composition chimique des huiles essentielles 4

III. Méthodes d'extractions des Huiles Essentielles 7

IV. Facteurs influençant la composition des huiles essentielles 8

IV.1. Facteurs intrinsèques 8

IV.2. Facteurs extrinsèques 8

V. Activité biologiques et mode d'action des huiles essentielles..... 9

V.1. Activité antimicrobienne 9

V.2. Activité antioxydantes 10

V.3. Activité anti-inflammatoire 10

V.4. Activité insecticide 11

VI. Toxicité des huiles essentielles 11

VII. Mode d'emploi des huiles essentielles..... 11

VII.1. Voie transcutané 11

VII.2. Voie pulmonaire 12

VII.3. Voie orale..... 12

VIII. Domaine d'utilisation des huiles essentielles 12

VIII.1. Agriculture..... 12

VIII.2. Cosmétique et parfumerie..... 12

VIII.3. Agroalimentaire	12
VIII.4. Médical et pharmaceutique.....	13

Matériel et méthodes

I. Matériel.....	14
I.1.Matériels végétal	14
I.2.Souches microbiennes.....	14
II.Méthodes	14
II.1.Extraction des huiles essentielles.....	14
III. Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	15
III.1.Activité antibactérienne.....	15
III.1.1.Préparation de la suspension bactérienne.....	15
III.1.2.Préparation des huiles essentielles	16
III.1.3.Méthode de diffusion sur agar.....	17
III.1.4.Détermination de la nature d'activité	17
III.1.5.Méthode de micro atmosphère	17
III.1.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	18
III.1.7.Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	19
III.2.Activité antifongique.....	19
III.2.1.Préparation de la suspension sporale.....	19
III.2.2.Méthodes de diffusion sur agar	20
III.2.3.Méthode de micro atmosphère	20
IV.Test anti-inflammatoire.....	21
V. Test <i>ex vivo</i> de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	22
V.1.Les différents traitements :	22
VI. Analyses statistiques	23

Résultas et Discussion

I. Activité antimicrobienne	24
I.1. Activité antibactérienne	24
I.1.1. Méthodes de diffusion sur agar	24
I.1.2. Détermination de la nature de l'activité (bactériostatique/ bactéricide)	29
I.1.3. Micro-atmosphère	30
I.1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	31
I.1.5. Détermination de la concentration minimale Bactéricide (CMB)	32
I.2. Activité antifongique	33
I.2.1. Méthode de diffusion	33
I.2.2. Méthode de Micro-atmosphère	34
II. Activité anti-inflammatoire	36
III. Teste d'activité antibactérienne des huiles sur <i>D. solani</i> ex vivo	38
Conclusion	40
Références bibliographiques	42

Annexe

Introduction

Introduction

Les maladies des plantes occupent une place centrale dans le système de production agricole, celles-ci sont reliés à plusieurs facteurs abiotiques et biotiques tel que les microorganismes phytopathogènes, qui représentent une menace majeure pour la production alimentaire et la stabilité de l'écosystème en engendrant des pertes importantes sur toutes les étapes de la chaîne alimentaire (Jan et *al.*, 2011).

Pendant les trois dernières décennies, les agriculteurs sont devenus dépendants des produits chimiques comme moyen relativement fiables de protection des cultures, en raison de leurs performances et leur facilité d'application (Jan et *al.*, 2011). Cependant, ces produits ont des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé humaine et ils peuvent provoquer une stimulation des systèmes de résistance des agents pathogènes (Betelho et Mendonça-hagleur, 2006).

En réponse aux problèmes causés par l'usage excessif de ces pesticides en agriculture, de nombreuses études ont été menées dans le but de trouver une alternative naturelle ayant des vertus bénéfiques pour l'homme et l'environnement.

Les bio-pesticides à base d'huiles essentielles présentent de nombreux avantages dans le domaine agricole et de la protection des cultures. Les huiles essentielles offrent en effet une large gamme d'activités ciblant différents organismes nuisibles pour les plantes. De plus, ces huiles se dégradent rapidement dans l'environnement en raison de leur volatilité élevée, ce qui signifie qu'elles ne persistent pas longtemps, après leur application, ce qui réduit leur impact sur l'environnement et les risques biologiques pour les mammifères et les autres organismes non ciblés (Alonso-Gato et *al.*, 2021).

Les HE de divers conifères, riches en terpènes tels que l' α -pinène, le β -pinène, le β -myrcène, le limonène et le camphène, sont connus pour produire différents composés volatils utilisés en médecine, en cosmétique et dans l'industrie alimentaire. Bien que plusieurs études portant sur la composition des HE de diverses espèces de *Pinus* ont été publiées au cours des 20 dernières années, aucune donnée n'est disponible sur les HE du pin noir poussant naturellement en Algérie (Adjaoud et *al.*, 2022).

Ce présent travail consiste à évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire de trois huiles essentielles extraites de différentes parties de *Pinus nigra* (cône, rameaux et feuilles) ainsi qu'à un test d'activité antibactérienne *ex vivo* sur des pommes de terre.

Ce travail se divise en trois parties distinctes : la première partie représente la synthèse bibliographique qui résume les principales études scientifiques reliées à la thématique traitée. La deuxième partie aborde les matériaux et méthodes, où nous avons exposé l'ensemble des protocoles suivis lors de la pratique. La troisième partie présente les résultats obtenus, les interprétations et la discussion en détail. Enfin, on termine par une conclusion globale sur la problématique traitée.

Partie

Bibliographique

I. Généralité sur les huiles essentielles

I.1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont définies comme étant des substances complexes odorantes et volatiles issu de plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires, ils sont également nommés essence ou éther (Berger, 2007).

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) ISO 9235:2021 définit les huiles essentielles comme « produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de fruits de citrus (agrumes), soit par distillation sèche, après séparation de l'éventuelle phase aqueuse par des procédés physiques (ISO, 2021).

I.2. Historique

La première utilisation des plantes aromatiques remonte à 40000 ans av J.-C., quand les aborigènes d'Australie les ont utilisées dans le traitement des infections par cataplasme ou fumigation. L'Inde est l'une des régions riches en plantes aromatique, il y a 7000 ans av J.-C., les indiens utilisaient les eaux aromatiques pour des rituels sacrés ainsi que dans le traitement des troubles de la santé. En Mésopotamie, les tribus utilisaient les huiles essentielles pour lutter contre les épidémies et à des fins religieuses 4000 ans av J.-C.

Les égyptiens, 3150-1085 avant J.-C., utilisaient les plantes aromatiques sous forme d'eau florale pour l'hygiène quotidienne et pour embaumer leurs morts avec des bandelettes à base de résine et d'essence aromatique. En 3000 ans av J.-C, ils importaient des plantes aromatiques de l'Ethiopie et de l'extrême orient pour extraire le principe actif de ces végétaux par différentes méthodes telles que la macération, la distillation et l'enfleurage.

La Chine vers 2800 ans av J.-C. utilisaient largement les plantes aromatiques et leurs extraits, pour leurs vertus thérapeutiques ce qui a permis l'apparition de la médecine traditionnelle chinoise. Vers 1200 ans av J.-C., les grecs faisaient le commerce des plantes médicinales avec les phéniciens et vers 1000 ans av J.-C. les perses ont inventé le premier procédé de distillation. Après 2000 ans, Avicenne ; médecin médiéval Persan, a pu produire une huile essentielle pure à partir des fleurs de roses. (Faucon, 2015).

I.3. Répartition et localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont synthétisées par des cellules sécrétrices spécifiques situées au niveau des fleurs, des feuilles, du bois, des fruits ou des racines des plantes (Lardry et Haberkorn, 2007a). Les HE sont stockés dans des structures histologiques spécialisées, telles que les cellules sécrétrices, les cavités, les canaux, les poches, les glandes et les poils sécréteurs (Bekkali et *al.*, 2008).

La partie de la plante utilisée pour l'obtention d'une huile essentielle doit être précisée, soit pour des considérations de rendement, soit parce que la composition chimique de la partie en question conduirait à des applications spécifiques très intéressantes (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).



Figure 1 : Structures histologiques de quelques appareils sécréteurs (Svoboda et Svoboda, 2000)

II. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges très concentrés et complexes, elles contiennent environ 200 composés ou plus et elles se caractérisent par 2 ou 3 composés majoritaires ayant des concentrations assez importantes (20 à 70%) par rapport aux autres composés minoritaires. Généralement ces composés majoritaires déterminent les activités biologiques des HE. La composition chimique des HE peut varier en fonction de la plante, des conditions de culture, de la période de récolte et de la méthode d'extraction (Bekkali et *al.*, 2008).

Les HE sont hydrophobes, solubles dans l'alcool, les solvants non polaires ou faiblement polaires et les cires. Sur le plan quantitatif, les teneurs en HE que les plantes peuvent contenir sont très faibles, voire inférieures à 1%. Des teneurs fortes de l'ordre de 15 % sont exceptionnellement rares et distinguées dans le cas du clou de girofle (Bouayed et Bohn, 2012).

Tableau I : Composition chimique des HE et leurs différentes propriétés et toxicité (Couic-Marinier et Lobstein, 2013a ;Faucon, 2015)

Composants chimiques	Propriétés	Toxicités
Monoterpènes(C10)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Toniques et stimulants, ○ Cortison-like, ○ Décongestionnants respiratoires, ○ Expectorants balsamique, ○ Lymphotoniques, ○ Immunostimulants. 	<p>Dermocostique</p> <p>Nephrotoxique</p>
Sesquiterpènes (C15)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anti-inflammatoires, calmants ○ Décongestionnants ○ Légèrement hypotenseurs ○ Antiallergiques 	<p>Aucune toxicité aux doses</p> <p>Physiologiques</p>
Monoterpèneol(C10)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anti-infectieux ○ Immunostimulants ○ Hyperthermisants ○ Hypertensifs ○ Neurotonique 	<p>Dermocostique</p> <p>Hépatotoxique à des doses non respectées</p>
Sesquiterpènesols(C15)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tonique, stimulants ○ Protecteurs cellulaires ○ Positivant ○ Décongestionnant 	<p>Non toxique</p>
Aldéhydes terpéniques	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anti-inflammatoires, ○ Antalgique, ○ Sédatifs, calmants ○ Tonique, stimulants ○ Hypotenseur ○ Antiseptiques ○ Vasodilateurs 	<p>Peu toxique</p>

Composants chimiques	Propriétés	Toxicités
Aldéhydes aromatiques	<ul style="list-style-type: none"> ○ Anti-infectieux ○ Tonifiants ○ Positivant 	<p>Non toxique a des doses thérapeutiques</p> <p>Dermocostique au niveau des muqueuses</p>
Monocétones et dicétones	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cicatrisants ○ Mucolytiques et fluidifiantes ○ Lipolytiques ○ Cholérétique ○ Négativants ○ Anti-parasitaire ○ Antalgique 	<p>Neurotoxique et abortives</p>
Esters	<ul style="list-style-type: none"> ○ Antispasmodique ○ Neurotonique ○ Rééquilibrant nerveux ○ Antidépresseurs ○ Apaisants ○ Négativants ○ Antalgique 	<p>Aucune toxicité aux doses</p> <p>Physiologiques</p>
Phénols méthyl-éthers	<ul style="list-style-type: none"> ○ Antispasmodique ○ Antalgique ○ Anti-inflammatoire ○ Antibactériens ○ Antiallergiques ○ Tonifiants ○ Rééquilibrant nerveux 	<p>Déromotoxicité et agressivité cutané</p>

III. Méthodes d'extractions des Huiles Essentielles

Les plantes restent une source inépuisable de substances bioactives, y compris les plantes aromatiques et médicinales. La qualité et l'activité de l'extrait dépendent fortement du

procédé d'extraction (Herzi et *al.*, 2013), et chaque procédé a pour but de capter et de collecter tous les composés des HE, subtils et fragiles que la plante synthétise, et cela sans en altérer leur qualité (Boukhatem et *al.*, 2010)

La méthode d'extraction par entraînement à la vapeur (figure 2) et l'hydrodistillation (figure3) sont traditionnellement les plus utilisées, elles sont économiques et faciles à réaliser (Kaloustian, et *al.*, 2012). La première méthode consiste à placer la plante ou une de ses parties sur une grille et ensuite la soumettre à la vapeur d'eau sans macération. La seconde technique consiste à mettre en contact direct le matériel végétal avec de l'eau bouillante en immersion tout en chauffant le mélange afin de permettre aux HE de s'évaporer. Cette étape est suivie d'un refroidissement qui permettra aux vapeurs de se condenser à l'aide d'un condensateur. L'eau et les molécules aromatiques récupérées se séparent en une phase aqueuse et organique. Cette méthode préserve la qualité des HE car l'eau qui les entoure agit comme une barrière qui les protège des températures élevées (Sovová, 2006 ; Farhin Khan, 2018).

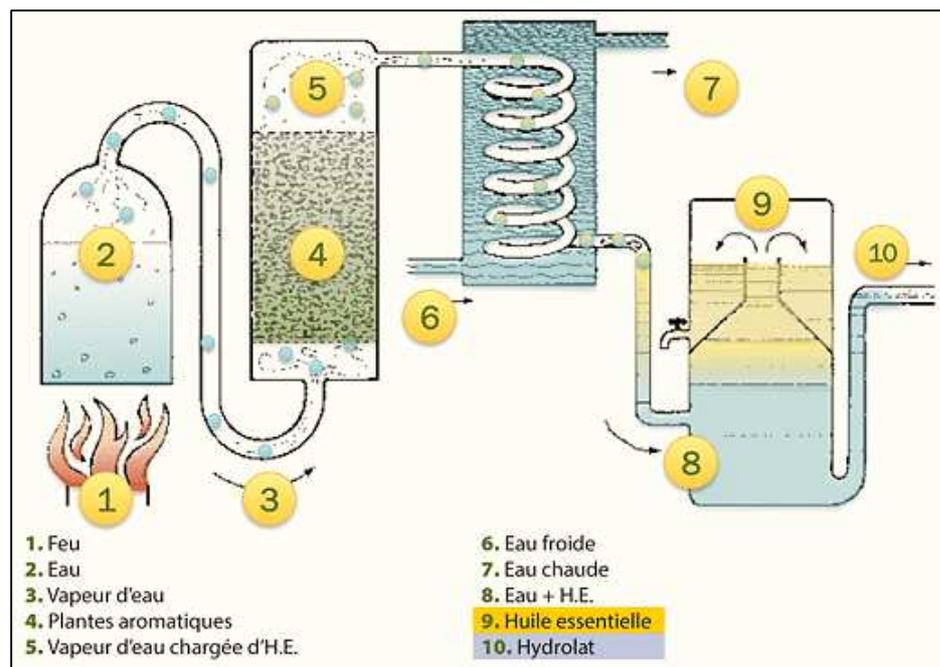


Figure2 : Principe de la vapo-distillation des huiles essentielles (Gratton, 2023)

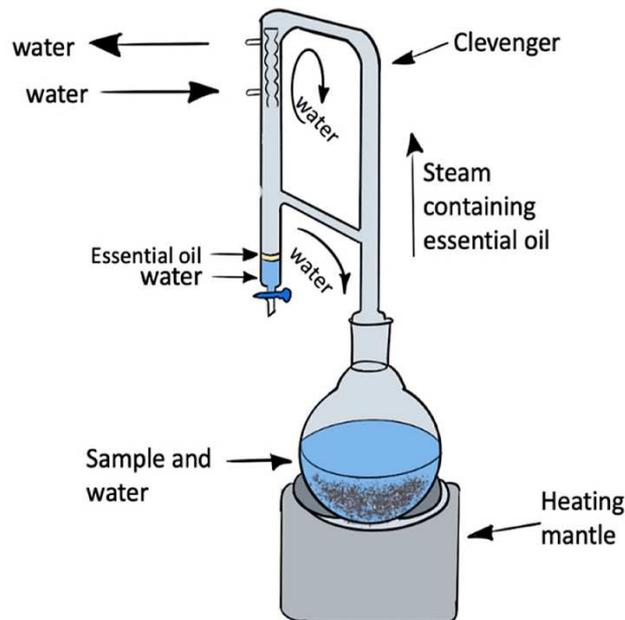


Figure 3 : Appareil Clevenger pour l'hydrodistillation (Teresa-Martínez et *al.*, 2022)

Cependant, il existe d'autres méthodes d'extraction des HE, telles que l'extraction assistée par micro-ondes, l'expression à froid, l'extraction par solvant, l'extraction par le CO₂ supercritique et l'enflourage, etc. (Farhin Khan, 2018).

IV. Facteurs influençant la composition des huiles essentielles

La teneur et la composition chimiques des HE sont sujettes à plusieurs facteurs intrinsèques à la plante (ou extrinsèques). Ces facteurs entraînent l'apparition de plusieurs races chimiques ou chémotypes au sein de la même espèce. La détermination du chémotypes d'une huile essentielle peut nous renseigner sur sa bio-activité et sa toxicité (Zouari, 2013).

IV.1. Facteurs intrinsèques

Les facteurs endogènes sont liés à la plante, telle que l'âge, le stade de développement physiologique, la partie de la plante (écorce, bois, fruits, péricarpe, graine ou racines) et leurs différents types de structures sécrétrices.

IV.2. Facteurs extrinsèques

Les variations de la composition des HE dépendent des conditions climatiques (la température, la durée du jour, l'humidité, la lumière, etc.) des conditions de culture (densité des plantes, date de semis, propriétés du sol, etc.), des techniques de culture et des pratiques culturales (irrigation, fertilisation et nutrition minérale) De-Groot, et *al.*, (2016).

Au cours de l'extraction, les paramètres de production, tels que le temps d'extraction, la température, la durée de séchage, le prétraitement du matériel végétal, les conditions de stockage (Nguyen et Németh, 2016) et d'autres paramètres comme l'exposition à l'oxygène et aux ultraviolets (De-Groot et *al.*, 2016) influencent la qualité des huiles essentielles.

V. Activité biologiques et mode d'action des huiles essentielles

Jusqu'à présent, aucune étude n'a pu donner une information claire et précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Vu la variabilité de leur composition chimique, il est très probable que leur activité ne soit pas attribuée à un mécanisme spécifique, mais, qu'il a plusieurs cibles dans la cellule (Burt, 2004).

V.1. Activité antimicrobienne

Les molécules les plus actives des huiles essentielles sont classées selon leur degré d'activité comme suit : aldéhyde>Phénol>alcoolmono-terpéniques> lactones >cétones >éthers> oxyde>phtalides>terpènes.

Différents modes d'action sont impliqués dans l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. L'activité de ces dernières peut affecter l'enveloppe externe de la cellule et le cytoplasme (Filomena, 2013). Elles génèrent des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire, ce qui induit des pertes de matière (cytoplasmique), des fuites d'ions, des pertes d'énergie (glucose, ATP), conduisant directement à la lyse de la cellule (cytolyse) et donc à sa mort. Une autre possibilité d'action est l'inhibition de la production d'amylase et de protéase qui stoppe la production des toxines, le flux d'électrons et entraîne la coagulation du contenu cellulaire (Bouayed et Bohn, 2012).

Généralement les huiles essentielles inhibent la croissance des microorganismes dans l'ordre suivant : Moisissures > Bactérie à Gram positif et les bacilles acido-alcool-résistants > Levure > Bactéries Gram négatif (Aoshima, 2012).

Généralement la plupart des HE sont plus actives sur les bactéries Gram positifs que sur les Gram négatifs, cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe (barrière lipopolysaccharidique) chez les Gram négatifs ce qui limite la diffusion des composés hydrophobes des huiles essentielles, alors que chez les Gram positifs, l'absence de cette membrane permet un contact direct entre ces derniers et la membrane interne (Burt, 2004 ; Filomena, 2013).

Les activités antifongiques sont assez similaires à celles décrites pour les bactéries. Les huiles essentielles ont également une action sur des enzymes clés pour les champignons, comme celles impliquées dans la synthèse de la chitine ou l'ergostérol, qui sont des composants essentiels de la membrane fongique.

La suppression du développement des organes de fructification et de sporulation par les HE a été observée pour plusieurs souches fongiques (*Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., etc.). Une efficacité de l'action ciblée des HE sur la phase de sporulation a été constatée suite à de nombreux travaux. Cette efficacité pourrait être liée à une période de vulnérabilité des cellules (formation de nouveaux organes), ce qui pourrait faciliter la pénétration des HE dans les cellules fongiques

Sur les virus, Il se trouve qu'une réduction du pouvoir infectant des virus est obtenue lorsque l'HE testée est ajoutée spécifiquement lors de la phase d'adsorption du virus sur la cellule hôte. L'HE agit principalement lors de la pénétration du virus dans la cellule en interférant avec les mécanismes d'adsorption membranaire. Le traitement par les HE après pénétration du virus à l'intérieur de la cellule hôte ne modifie pas l'activité virale. L'enveloppe virale au moment de l'adsorption serait la cible privilégiée des HE (Faucon, 2015).

V.2. Activité antioxydante

Le potentiel antioxydant des HE est dû à ses nombreux composés actifs. L'activité de ces derniers est liée à leur structure. Les principaux composés dotés d'activité antioxydante sont les alcools, les cétones, les aldéhydes, les éthers et les mono-terpènes (Malik, 2019).

V.3. Activité anti-inflammatoire

En plus de leur capacité à piéger les radicaux libres, les HE ont montré une efficacité remarquable dans le traitement des maladies inflammatoires, telle que les allergies, le rhumatisme ou l'arthrite (Sharmeen *et al.*, 2020). L'huile essentielle de camomille est utilisée depuis des siècles comme anti-inflammatoire et pour soulager les symptômes associés à l'eczéma, à la dermatite et à d'autres maladies.

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être attribuée à leurs interactions avec les cascades de signalisation impliquant des cytokines et des régulateurs et à l'expression des gènes pro-inflammatoires (Miguel *et al.*, 2010).

V.4. Activité insecticide

Les extraits de plantes sont utilisés depuis longtemps comme des insecticides, par exemple, le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont reconnus pour leurs propriétés insecticides et sont utilisés dans la lutte contre les insectes (Aouinty *et al.* 2006).

VI. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des agents puissants et doivent être utilisés avec prudence afin d'éviter d'éventuelles effets indésirables (Price *et al.*, 1998).

La toxicité d'une HE donnée peut varier en fonction de sa composition, en général, l'alcool, les aldéhydes et les constituants phénoliques sont responsables de la cyto-toxicité des HE (Raut, 2014). Les risques sanitaires évoqués sont :

- Un pouvoir irritant* : HE riche en phénols, aldéhydes, monoterpènes et éthers (Faucon, 2015).
- Un pouvoir allergène* : HE riche en cinnamaldéhyde ex; la cannelle, la camomille, la lavande, la mélisse, le persil, la menthe poivrée et la sauge (Raut, 2014).
- Un pouvoir Photo-toxique et photo-sensibilisant* : HE riches en furano-coumarines.
- Un pouvoir nécrotique* : L'HE de *Juniperus sabina* en raison de son utilisation à une longue durée et/ou à de fortes doses.
- Un pouvoir narcotique* : HE contenant l' α -thujone et la β -Thujone qui sont des cétones toxiques provoquant une paralysie en cas d'application à des doses élevées.
- Un pouvoir abortif* : HE riche en cétones et quelques types de phénols (Faucon, 2015).
- Un pouvoir néphrotoxique* : HE riche en hydrocarbures monoterpéniques qui provoque des irritations et des lésions au niveau des reins.
- Un pouvoir hépatotoxique* : Plusieurs huiles essentielles prises par voie orale à de fortes doses peuvent endommager le foie (Raut, 2014).

VII. Mode d'emploi des huiles essentielles

Il existe trois voies d'administration des HE : Voie transcutanée, voie pulmonaire (inhalation), et voie orale (Lardry et Haberkorn, 2007b ; Couic-Marinier Et Lobstein, 2013b).

VII.1. Voie transcutané

L'emploi des HE par la voie externe permet leur pénétration dans la peau entre 20 à 80 mm de profondeurs, et pour une meilleure pénétration une dilution de 20 à 50% d'HE dans une huile grasse fine est nécessaire. Le traitement se fait par différentes formes : massage, bains aromatiques, fumigations, masques, cataplasme, etc.

VII.2. Voie pulmonaire

Les HE peuvent être utilisés soit par diffusion générale (dans l'atmosphère) à l'aide d'un diffuseur d'arômes ou d'un brûle-parfum, soit par diffusion individuelle (Inhalation).

VII.3. Voie orale

L'HE pure ne peut pas être utilisée directement par voie orale mais plutôt diluer à raison de 5 à 15%. Dans le cas où le but de l'utilisation est thérapeutique l'avis du médecin est obligatoire. (Lardry et Haberkorn, 2007b).

VIII. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

VIII.1. Agriculture

Les cultures agricoles sont toujours sous risque de s'endommager par les prédateurs dans les champs et par des maladies liées aux mauvaises conditions de stockage après la récolte, ce qui entraînent une réduction de la production agricole et des pertes financières importantes pour les agriculteurs. Ces derniers utilisent des pesticides, des fongicides et d'autres traitements chimiques pour lutter contre ces ravageurs et minimiser les dégâts. Malheureusement, ces produits ont des effets néfastes sur la plante, l'environnement et le consommateur. Les HE ayant des propriétés répulsives, antimicrobiennes contre les ravageurs sont largement utilisées comme moyen de lutte naturel et efficace (Hanif, 2019 ; Sharmeen et *al.*, 2020).

Les HE ont également des propriétés insecticides, notamment larvicides, ovicides et antiféodales (Hanif et *al.*, 2019). Alikhani et Garmakhany (2014) ont montré que le traitement des fruits de mangue en post-récolte avec les extraits de *Thymus vulgaris L.* et *Rosmarinus officinalis L.* ont réduit le pourrissement, prolonger la durée de stockage et préserver la qualité des fruits (Sharmeen, et *al.*, 2020).

VIII.2. Cosmétique et parfumerie

Dans l'industrie cosmétique de nombreuses HE sont utilisés dans la fabrication des crèmes pour la peau, des baumes, des shampooings, des savons et des parfums (Raut et Karuppayil, 2014).

VIII.3. Agroalimentaire

Les huiles essentielles des plantes et des épices sont réputées pour leurs arômes et saveurs distinctifs, qui sont le résultat de leur composition chimique complexe. (Adelakun et *al.*, 2016). Les HE sont utilisés en tant qu'arôme et additif dans les denrées alimentaires, pour prolonger leur durée de conservation et maintenir leur qualité (Burt, 2004). Elles renforcent

ainsi les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des matériaux d'emballages (Ni et *al.*,2021).

VIII.4. Médical et pharmaceutique

Les huiles essentielles ont un rôle primordial dans le domaine médical en raison de leurs propriétés médicinales, thérapeutiques et antiseptiques.Elles ont un effet fongicide, antidépresseur, antibactérien, anticancéreux, stimulant et relaxant. Les HE peuvent être utilisées comme agents thérapeutiques efficaces pour le traitement des maladies infectieuses (Hanif et *al.*, 2019).

*Matériel
& Méthodes*

La partie expérimentale a été réalisée au sein du Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables LMER (équipe biomasse et environnement) et du Laboratoire de Mycologie, durant une période de trois mois (Mars-Mai 2023).

Le but principal de ce travail était d'évaluer les activités biologiques de trois huiles essentielles (HE) extraites des différentes parties aériennes de *Pinus nigra* ssp. *mauritanica* sur trois espèces bactériennes et trois espèces fongiques phytopathogènes.

Un test ex vivo a été effectué dans le but de vérifier la capacité de nos huiles à protéger les pommes de terre durant la période post-récolte.

I. Matériel

I.1. Matériels végétal (Annexe III)

I.2. Souches microbiennes

En vue d'étudier l'activité antibactérienne et antifongique des HE, trois souches bactériennes et trois espèces fongiques sont utilisées (tableau II). Les souches nous ont été fournies par le laboratoire LMER.

Tableau II : Les souches bactériennes et les espèces fongiques utilisées

Les souches bactériennes	Les souches fongiques
<ul style="list-style-type: none">• <i>Dickeya dadantii</i> (Dd)	<ul style="list-style-type: none">• <i>Aspergillus niger</i> (An)
<ul style="list-style-type: none">• <i>Dickeya solani</i> (Ds)	<ul style="list-style-type: none">• <i>Alternaria</i> sp. (Alt)
<ul style="list-style-type: none">• <i>Pectobacterium carotovorum</i> (Pcc)	<ul style="list-style-type: none">• <i>Penicillium</i> sp. (Pen)

II. Méthodes

II.1. Extraction des huiles essentielles

L'hydrodistillation est le procédé suivi pour extraire les HE du végétal au moyen d'un dispositif d'extraction de type Clevenger (Figure 4). Cette méthode consiste à introduire 150 g du végétal, coupé grossièrement, dans un ballon rempli avec une quantité d'eau distillée suffisante pour recouvrir la matière végétale. Le mélange est porté à ébullition pendant 3

heures. Les vapeurs chargées d'huile passent à travers le serpentin de refroidissement en verre où aura lieu la condensation. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse en ajoutant du sulfate de sodium anhydre. Enfin, l'huile obtenue est conservée dans des flacons ambrés, bien scellés et réfrigérés à 4°C (Adjaoud et *al.*, 2022).



Figure 4 : Extraction des huiles essentielles des différentes parties de *P. nigra* par hydrodistillation

III. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

III.1. Activité antibactérienne

III.1.1. Préparation de la suspension bactérienne

A partir d'une culture bactérienne jeune (18-24 heures), trois colonies bien isolées ont été prélevées et introduites dans 10ml de bouillon nutritif BN (Annexe I). La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée au Vortex et sa densité optique est mesurée à une longueur d'ondes de 600nm et ajustée afin d'obtenir une culture bactérienne d'une DO de 0.08 à 0.1, l'équivalent de 10^7 UFC/ml.

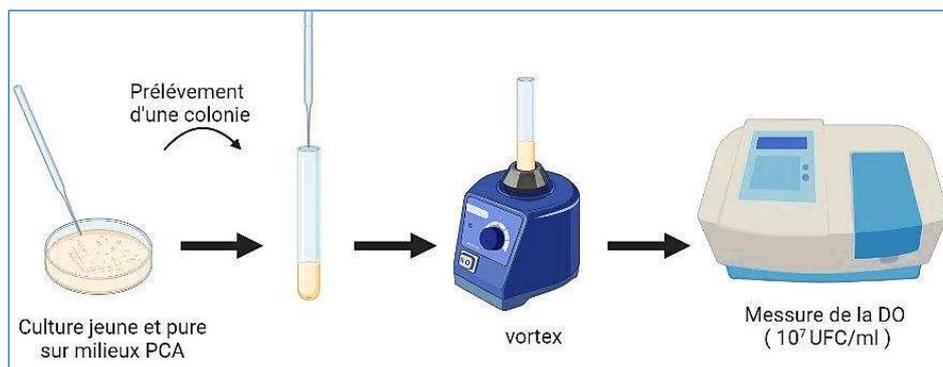


Figure 5 : Préparation de la suspension bactérienne

III.1.2. Préparation des huiles essentielles

En plus des huiles pures, la dilution $D_{1/2}$ des quatre huiles a été préparée et testée afin de vérifier l'effet de la dilution sur les différentes activités. La $D_{1/2}$ est préparée en mélangeant un volume de l'huile pure avec le même volume de DMSO (Diméthylsulfoxyde).

L'effet de synergie entre les trois huiles a été confirmé en réalisant un mélange dans lequel des volumes égaux de chaque huile ont été additionnés.

Ainsi, les formulations testées sont :

- 1) Cônes Pure (HE pure de la partie cône de *Pinus nigra*) ;
- 2) Cônes $D_{1/2}$ (HE de la partie cône de *Pinus nigra*, diluée à 1/2) ;
- 3) Rameaux Pure (HE pure de la partie rameaux de *Pinus nigra*) ;
- 4) Rameaux $D_{1/2}$ (HE de la partie rameaux de *Pinus nigra*, diluée à 1/2) ;
- 5) Feuilles Pure (HE pure de la partie feuilles de *Pinus nigra*) ;
- 6) Feuilles $D_{1/2}$ (HE de la partie feuilles de *Pinus nigra*, diluée à 1/2) ;
- 7) Cônes + Rameaux (HE pure des cônes + HE pure des rameaux) ;
- 8) Cônes + Feuilles (HE pure des cônes + HE pure des feuilles) ;
- 9) Rameaux + Feuilles (HE pure des rameaux + HE pure des feuilles) ;
- 10) Cônes + Rameaux + Feuilles (HE pure des cônes + rameaux + feuilles).

III.1.3.Méthode de diffusion sur agar

La méthode de diffusion sur agar est utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des trois HE. Le test est réalisé comme suit (Laouer, 2004) :

Des boîtes de pétri remplies de gélose Muller Hinton (annexe I) sontensemencées avec la suspension bactérienne standardisée par la technique d'écouvillonnage. Des disques en papiers chromatographiques stérile de 6mm de diamètre imbibés par 10ul de l'huile essentielle (les 10 formulations) sont déposés à la surface de la géloseensemencée (Chaque boîte comporte trois dépôts d'HE de concertation similaire afin de garantir les mêmes conditions expérimentales) ;

Afin de valider les résultats, le test est réalisé en duplicata et des témoins positifs et négatifs sont préparés en parallèle.

- **Témoin négatif** : Par dépôt de 10ul de DMSO sur chaque disque ensuite dépôt des disques dans les boîtes préalablementensemencées avec la suspension bactérienne.
- **Témoin positif** : Par dépôt de 3 disques d'antibiotiques (Ampicilline, Amoxicilline, Pénicilline) dans des boîtesensemencées avec la suspension bactérienne.

Les boîtes sont laissées environ 2h à température basse (4°C) puis incubées à 30°C pendant 24h. Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

III.1.4.Détermination de la nature d'activité

Dans le but de déterminer la nature de l'activité de nos huiles, des prélèvements sont effectués aux niveaux des zones d'inhibition apparues autour des disques. Les prélèvements sont ensuite transférés dans des tubes eppendorfs contenant 1ml de milieu BN, bien mélangés puis incubés à 30°C pendant 24h. La lecture des résultats est faite comme suit :

- L'apparition d'un trouble indique un effet bactériostatique
- L'absence de trouble indique un effet bactéricide.

III.1.5.Méthode de micro atmosphère

Les mêmes étapes du test de diffusion sont suivies pour la réalisation de ce test, la seule étape qui diffère est celle du dépôt des disques chargés de l'HE (formulations 1, 3 et 5). Le disque chargé de 20ul de l'une des HE est fixé au centre du couvercle afin de vérifier

l'activité de la fraction volatile (figure 6). Après incubation, la croissance des différentes souches est observée (koffi et *al.* (2013).

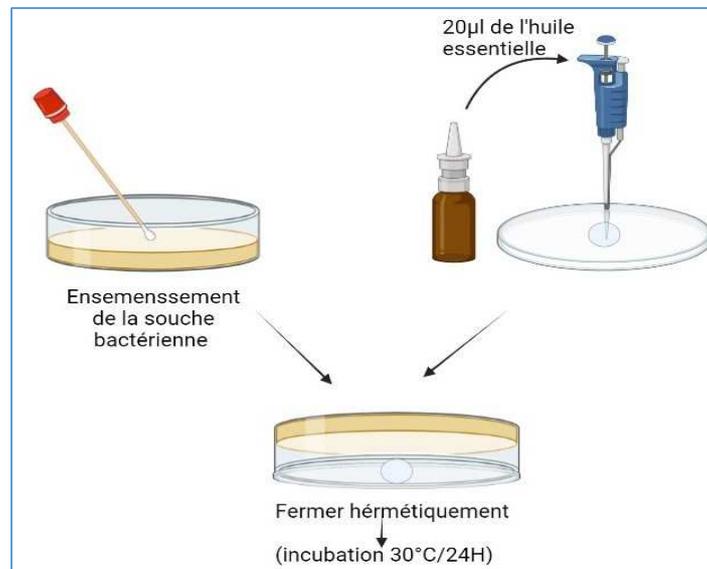


Figure 6 : Activité antibactérienne des HE par la méthode de micro-atmosphère

III.1.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La technique utilisée pour la détermination de la CMI de nos huiles est celle des microdilutions en milieu liquide (figure 7) décrite par Ghavam et *al.* (2020). Cette méthode est réalisée comme suit :

Une solution mère de l'HE (2000 µg/ml) est préparée dans un mélange de BN et de DMSO, puis diluées de manière appropriée en utilisant le même mélange pour obtenir différentes concentrations (1000, 500, 250, 125, 62.5 mg/ml).

Des microplaques stériles à 96 puits sont remplies avec 95 µl de milieu de culture, 5 µl de suspension bactérienne (10^7 UFC/ml) et 100 µl d'huile essentielle à différentes concentrations. Les microplaques sont par la suite incubées à 30 °C pendant 24 heures.

Afin de valider ces résultats, les puits de la première et la deuxième ligne verticale de la microplaque sont utilisés comme témoins.

Après incubation, la CMI de chaque HE est déterminée, elle correspond au premier puits de la gamme de concentration, dépourvu de toute croissance bactérienne.

Remarque :

Chaque microplaque est utilisée pour le test d'une HE sur une souche bactérienne. Les puits des trois premières lignes horizontales de la microplaque sont utilisés pour tester la souche (une ligne verticale correspond à une répétition). Ci-dessous une image illustrant les différentes étapes du test.

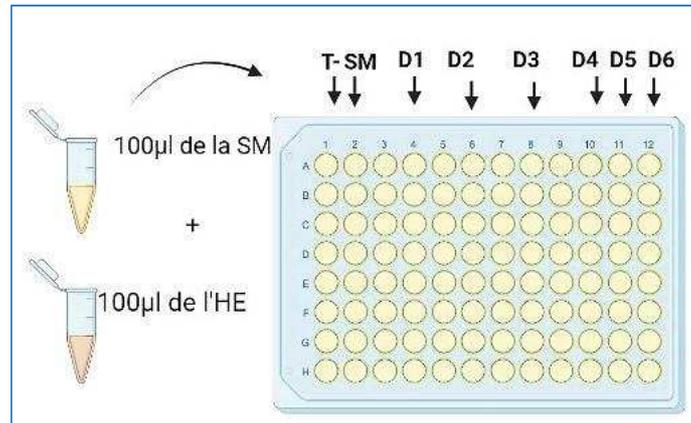


Figure 7 : Teste de détermination de la CMI sur microplaque

T- : Témoin : BN non inoculé ; **SM:** BN inoculé avec $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de la culture bactérienne ; **D :** 100µl de BN inoculé avec $5 \cdot 10^6$ UFC/ml de la culture bactérienne + 100 µl de la dilution D de HE (**D1** : 2 mg/ml ; **D2** : 1 mg/ml ; **D3** : 0.5 mg/ml ; **D4** : 0.25 mg/ml ; **D5** : 0.125 mg/ml ; **D6** : 0.0625 mg/ml)

Durant ce test, uniquement les CMI des huiles des formulations 1et 10 ont été déterminées sur la souche DS.

III.1.7.Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB de chacune des HE est déterminée comme suit :

A partir des puits négatifs (aucune croissance bactérienne), 50ul sont prélevés et ensemencés sur milieu TSA (annexe I). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h. La CMB correspond à la concentration la plus basse à laquelle aucun signe de croissance n'est observé.

III.2.Activité antifongique

III.2.1.Préparation de la suspension sporale

Un volume d'eau physiologique d'environ 5 ml est versé dans une boîte contenant l'un des champignons ; *Aspergillus niger*, *Alternaria* sp. et *Penicillium* sp., âgé de 7jours. La surface est raclée à l'aide d'un râteau afin de récupérer les spores fongiques. Le mélange de

spores obtenu est récupéré par une micropipette puis dilué dans de l'eau physiologique de façon à obtenir une concentration de 10^5 spore/ml. La concentration des spores est déterminée par le dénombrement sur une lame de Malassez. La figure ci-dessous montre les différentes étapes suivies.

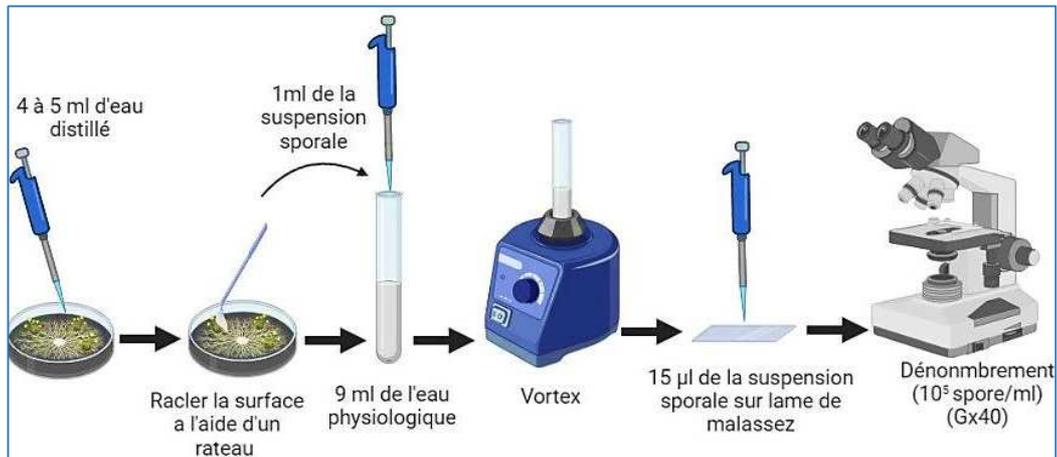


Figure 8 : Préparation de la suspension sporale

III.2.2.Méthodes de diffusion sur agar

La technique utilisée est la même que celle décrite dans la section (III.1.3). Le milieu utilisé est le PDA et l'incubation est réalisée à 25°C pendant 72h.

III.2.3.Méthode de micro atmosphère

Sur milieu PDA un disque de 5 mm de diamètre de l'un des champignons est déposé au centre de la boîte. Un disque de papier chromatographique stérile est imbibé de 20 µl de l'huile essentielle de l'une des formulations 1,3 ou 5, puis fixé au centre du couvercle afin de vérifier l'activité de la fraction volatile. Les boîtes sont ensuite fermées et bien scellées avec du parafilm et incubées à 25°C pendant 72h. Après incubation, la croissance des champignons est observée et les diamètres sont mesurés. Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule suivante :

$$n = [(a-b)/a] \times 100$$

n : Pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

a : Diamètre moyen de mycélium dans la boîte de témoin (cm).

b : Diamètre moyen de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (cm).

La figure ci-dessous montre les différentes étapes suivies.

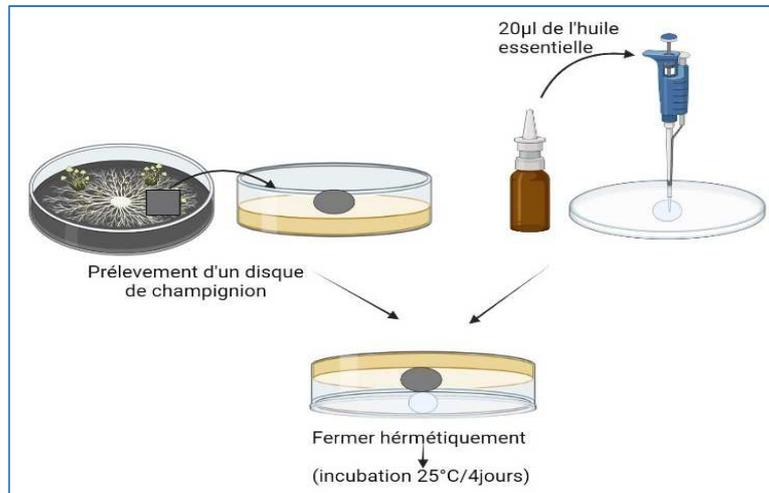


Figure 9 : Activité antifongique des HE par la méthode de micro-atmosphère

IV. Test anti-inflammatoire

La capacité des HE à protéger la protéine (ovalbumine OA) de la dénaturation induite par la chaleur est vérifiée par le test de dénaturation *in vitro*, décrit par Nea et al., (2019) avec quelques modifications. Ce test consiste à préparer 4 solutions d'un volume de 0.5 ml :

- **La solution d'essai** : composé de 0,45 ml de la solution aqueuse d'OA à 2 % et de 0,05 ml de l'HE à différentes concentrations (10 mg/ml, 5 mg/ml et 1 mg/ml).
- **La solution contrôle** : composé de 0,45 ml de la solution aqueuse d'OA à 2 % et de 0,05 ml de DMSO (control).
- **La solution contrôle produit** : composé de 0,45 ml de DMSO et de 0,05 ml de la solution de l'HE à différentes concentrations (10 mg/ml, 5 mg/ml et 1 mg/ml).
- **La solution standard test** : composée de 0,45 ml de la solution aqueuse d'OA à 2 % et de 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodique (médicament de référence) à différentes concentrations (10 mg/ml, 5 mg/ml et 1 mg/ml).

Toutes les solutions sont incubées à 37 °C pendant 20 minutes, puis à 57 °C pendant 3 minutes. Après refroidissement, 2,5 ml de tampon phosphate (Annexe II) sont ajoutés aux solutions. L'absorbance est ensuite mesurée à 660 nm.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante: (Chandra *et al.*, 2012)

$$\% \text{ Inhibition} = 100 (Vt / Vc - 1)$$

Vt : solution d'essai

Vc : solution contrôle

V. Test *ex vivo* de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Afin de vérifier la capacité de l'HE (cônes + rameaux + feuilles), à contrôler la croissance des microorganismes phytopathogènes en *ex vivo*, la souche bactérienne *Dickeya solani* et *Solanum tuberosum* (Pomme de terres) sont utilisées dans l'expérience. Le test est réalisé comme suit :

- ✓ Désinfecter les pommes de terre sélectionnées par immersion dans une solution à 2% d'hypocrolite de sodium pendant 1 à 2 min, ensuite les laver avec de l'eau distillée stérile et les sécher à l'aide d'un papier absorbant stérile ;
- ✓ Réaliser des puits au centre de chaque tubercule (3mm largeur x 3mm de profondeur) afin de pouvoir inoculer la suspension bactérienne et l'HE ;
- ✓ Mettre 30 ul de l'HE dans chaque trou, laisser agir pendant 10 min puis rajouter 15ul de la suspension bactérienne préalablement standardisée à 10^7 UFC/ml ;
- ✓ Transférer Les tubercules traités dans des boîtes stériles contenant du papier absorbant stérile humecté avec de l'eau distillé stérile (3 tubercules par boîte) ;
- ✓ Incubation à 30°C pendant 7 jours ;
- ✓ Le test est réalisé en duplicata

V.1. Les différents traitements :

- **Teste 1** : Inoculation avec 30 µl de l'HE puis ajout de 15 µl de la suspension bactérienne
- **Témoin 1** : Inoculation avec 30 µl d'eau physiologique stérile
- **Témoin 2** : Inoculation avec 30µl de l'HE
- **Témoin 3** : Inoculation avec 15 µl de la suspension bactérienne

Afin de mettre en évidence l'effet protecteur des huiles essentielles. Les pommes sont photographiées et les surfaces de lyse sont mesurées par le logiciel Image J.

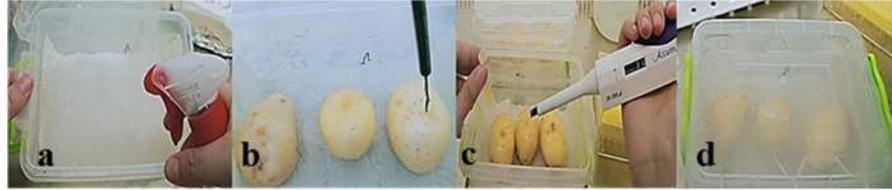


Figure 10 : Les différentes étapes suivies dans le test *ex vivo* sur pommes de terre

a : Humidification des boîtes; **b** : Réalisation des puits; **c** : Traitement ; **d** : Incubation

VI. Analyses statistiques

Une analyse de la variance (ANOVA) est réalisée à l'aide du logiciel GraphPadPrism® version 6.01. Dans le cas où des différences significatives sont détectées, le test de comparaison multiple des moyennes LSD est réalisé.

Résultats & Discussion

I. Activité antimicrobienne

I.1. Activité antibactérienne

I.1.1. Méthodes de diffusion sur agar

Ce test a permis d'évaluer le potentiel antibactérien de la fraction diffusible de nos huiles, ainsi que la sensibilité des souches testées. Selon Ponce et *al.* (2003) et Boutabia et *al.*(2016), la sensibilité des germes peut être prise en considération en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (D) en utilisant l'échelle suivante :

Non sensible (-) $D \leq 6\text{mm}$	Sensible (+) $7\text{mm} \leq d \leq 14\text{mm}$	Très sensible (++) $15\text{mm} \leq d \leq 19\text{mm}$	Extrêmement sensible (+++) $D \geq 20\text{mm}$
---	--	---	--

- *Les témoins négatifs et positifs*

Les résultats des témoins négatifs (DMSO) et positif (Antibiotiques) de l'activité antibactérienne sont présentés dans la figure suivante.

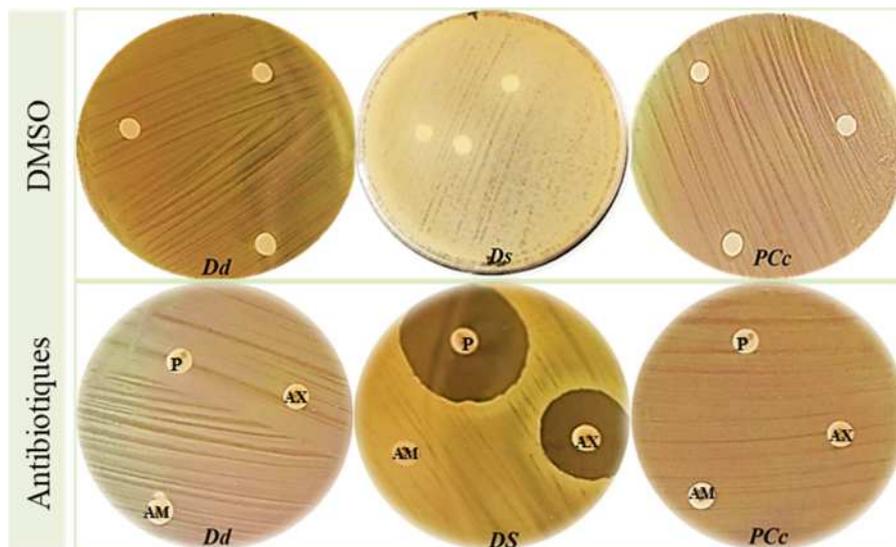


Figure 11: Activité de DMSO et des Antibiotiques sur les souches bactériennes

AX : Amoxicilline ; AM : Ampicilline ; P : Pénicilline

Les résultats obtenus montrent que le DMSO n'a pas d'activité antibactérienne sur les souches testées. D'après l'antibiogramme réalisé, on a constaté que la souche Ds est extrêmement sensible à l'amoxicilline, et à la Pénicilline, et résistante à l'ampicilline, tandis que les souches Dd et Pcc sont résistantes aux trois antibiotiques.

• *L'activité des huiles pures et diluées*

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles pures et des dilutions 1/2 des trois parties de *P. nigra*, sont présentés dans la figure et le graphe suivants.

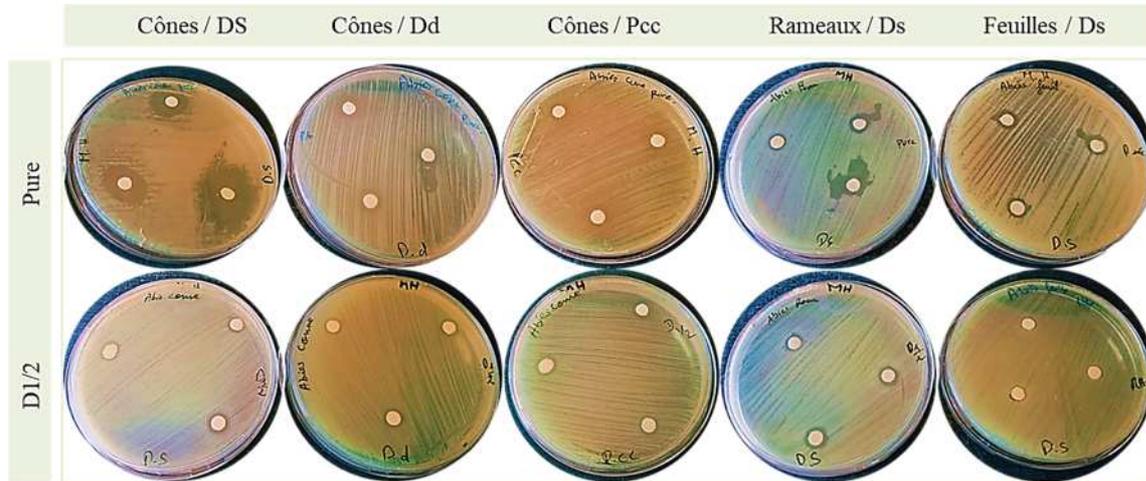


Figure 12 : Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *P. nigra*

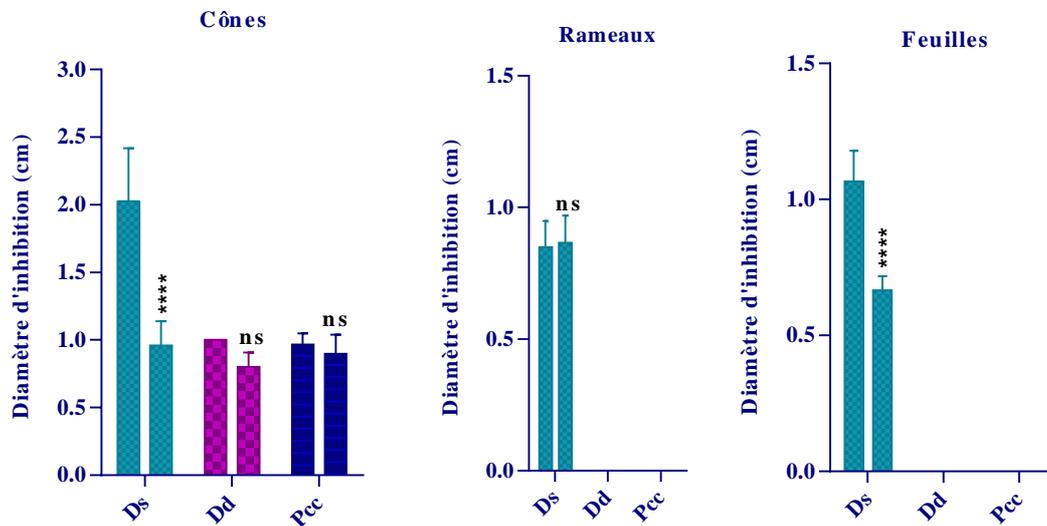


Figure 13 : Diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur les souches bactériennes sous l'action des huiles essentielles de *P. nigra*

Ds : *Dickeya solani*, Dd : *Dickeya dadantii*, Pcc : *Pectobacterium carotovorum* : Non significative ($p \geq 0,05$) ;

* : significatif ($0,05 \geq p \geq 0,01$) ; ** : Significatif ($0,01 \geq p \geq 0,005$) ; **** : significatif ($p < 0,0001$)

D'après les résultats l'HE cône pure présente une activité inhibitrice sur l'ensemble des souches bactériennes Pcc, Dd et Ds (0.9 ± 0.08 cm, $1\text{cm} \pm 0.00$ et 2.02 ± 0.39 cm) respectivement. La dilution D $\frac{1}{2}$ présente également un effet inhibiteur sur les trois souches, Cependant, sur la souche Ds les valeurs sont inférieures significativement ($p < 0.0001$) aux valeurs obtenues avec l'huile pure (D $\frac{1}{2}$: 0.95 ± 0.18 cm, Pure : 2.02 ± 0.39 cm). Sur les deux autres souches, aucune différence significative ($p > 0.05$) entre les valeurs de l'huile cônes pure et D $\frac{1}{2}$ n'est observée.

L'HE rameaux pure et la D $\frac{1}{2}$ sont actives uniquement sur la souche Ds (0.85 ± 0.1 et 0.86 ± 0.1), l'analyse statistique ne montre aucune différence significative ($p > 0.05$) entre l'effet inhibiteur de l'HE pure et la D $\frac{1}{2}$.

L'HE de la partie feuille, montre des résultats proches de ceux obtenus avec l'HE rameaux. L'HE pure et la D $\frac{1}{2}$ sont actives uniquement sur la souche Ds (1.06 ± 0.1 et 0.66 ± 0.05), l'analyse statistique montre une différence significative ($p > 0.0001$) entre l'effet inhibiteur de l'HE pure et la D $\frac{1}{2}$.

Selon Ponce et al. (2003), la sensibilité du germe est estimée par la mesure du diamètre d'inhibition, en se référant à l'échelle proposée par Ponce et al. (2003) et Boutabia et al., (2016), nos souches peuvent être classées comme suit (tableau III)

Tableau III : Degrés de sensibilité des souches Ds, Dd et Pcc aux HE testées

		Ds	Pcc	Dd
Cônes	Pure	Extrêmement sensible	Sensible	Sensible
	D $\frac{1}{2}$	Sensible	Sensible	Sensible
Rameaux	Pure	Sensible	Résistante	Résistante
	D $\frac{1}{2}$	Sensible	Résistante	Résistante
Feuilles	Pure	Sensible	Résistante	Résistante
	D $\frac{1}{2}$	Sensible	Résistante	Résistante

La souche Ds est la plus sensible des souches, elle est extrêmement sensible à l'HE cône pure et sensible à toutes les autres huiles. Les deux souches Dd et Pcc montre le même profile, elles sont sensible à l'huile essentielle de la partie cône (pure et diluée) et résistante aux HE des feuilles et des rameaux (pure et diluée)

• *Test de synergie*

Cette expérimentation nous a permis d'évaluer l'effet de synergie entre l'ensemble des huiles essentielles de *Pinus nigra*. La figure et les graphes suivants représentent les résultats de l'activité antibactérienne des formulations suivantes.

- 1) Cônes + Rameaux (HE pure des cônes + HE pure des rameaux) ;
- 2) Cônes + Feuilles (HE pure des cônes + HE pure des feuilles) ;
- 3) Rameaux + Feuilles (HE pure des rameaux + HE pure des feuilles) ;
- 4) Cônes + Rameaux + Feuilles (HE pure des cônes + rameaux + feuilles).

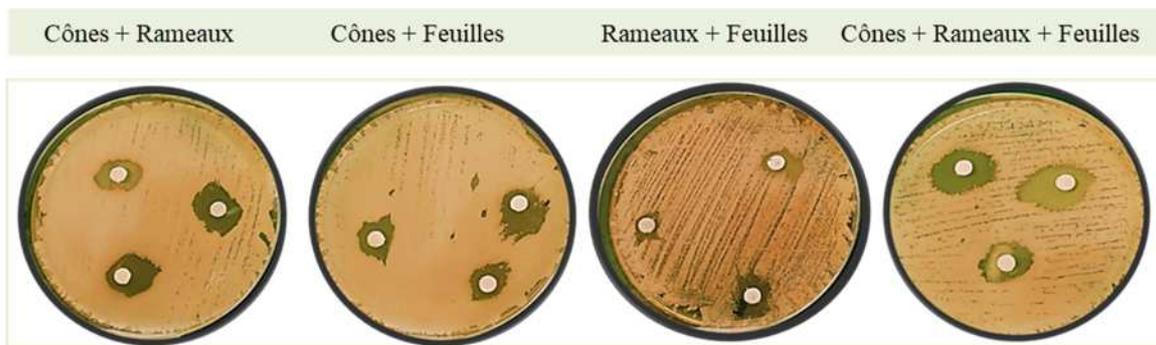


Figure 14 : Résultats de l'activité antibactérienne des différents mélanges des HE de *P. nigra*

Afin de vérifier l'effet synergique des mélanges préparés, des graphes de l'huile pure (cônes, rameaux ou feuilles) avec les mélanges préparés sont réalisés (figure 15 et 16).

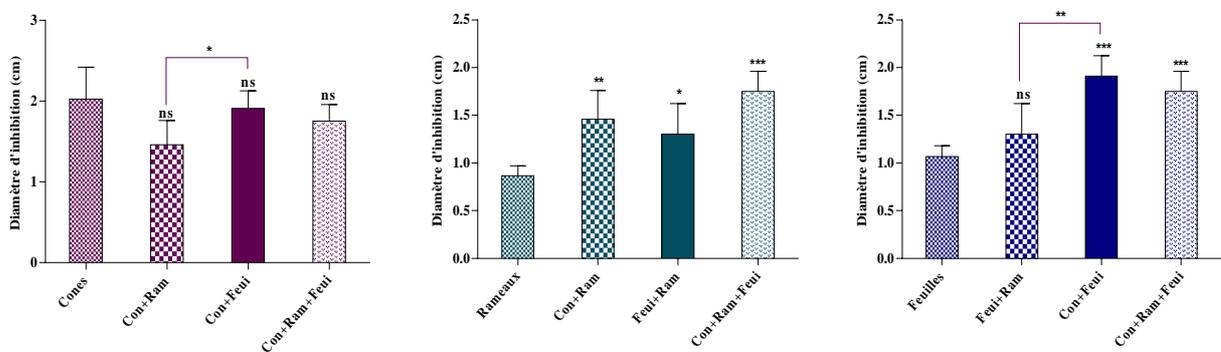


Figure 15 : Diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur la souche Ds sous l'action des différents mélanges des HE de *P. nigra*

➤ *Comparaison des mélanges avec l'huile Cônes pure*

Les mélanges : cônes+feuilles ; cône +rameaux et cône + feuilles+rameaux, ont montré une activité antibactérienne intéressante sur la souche Ds avec des diamètres d'inhibition de 1.90 ± 0.21 cm, 1.45 ± 0.3 cm et 1.75 ± 0.2 cm respectivement. On constate qu'aucun des mélanges n'a donné des valeurs meilleures que celle de l'huile cônes toute seule. L'analyse statistique a montré une différence significative ($p < 0.01$) entre l'huile cônes et le mélange cône rameaux, ce dernier a montré un effet antagoniste. Les autres mélanges semblent avoir le même effet que l'huile pure ($p > 0.05$).

➤ *Comparaison des mélanges avec l'huile rameaux pure*

Dans le cas de l'huile Rameaux, les mélanges : rameaux+cônes ; rameaux+feuilles et rameaux+cônes+feuilles, ont montré une activité antibactérienne intéressante sur la souche Ds avec des diamètres d'inhibition de 1.45 ± 0.3 cm et 1.30 ± 0.32 cm et 1.75 ± 0.2 cm respectivement. On constate que ces mélanges montrent un effet synergique qui est significativement supérieur à celui de l'huile rameaux seule (0.85 ± 0.1).

➤ *Comparaison des mélanges avec l'huile feuilles pure*

Dans le cas de l'huile Feuille, les mélanges : Feuilles+cônes ; feuilles+rameaux et feuilles+cônes+rameaux, ont montré une activité antibactérienne intéressante sur la souche Ds avec des diamètres d'inhibition de 1.90 ± 0.21 cm ; 1.30 ± 0.32 cm et 1.75 ± 0.2 cm respectivement. Comme dans le cas de l'huile rameaux, on constate que les mélanges d'huiles montrent un effet synergique et qui est significativement supérieur à celui de l'huile feuilles seule (0.85 ± 0.1).

Les graphes ci-dessous montrent les diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur les souches Dd et Pcc sous l'action des différents mélanges des HE de *P. nigra*

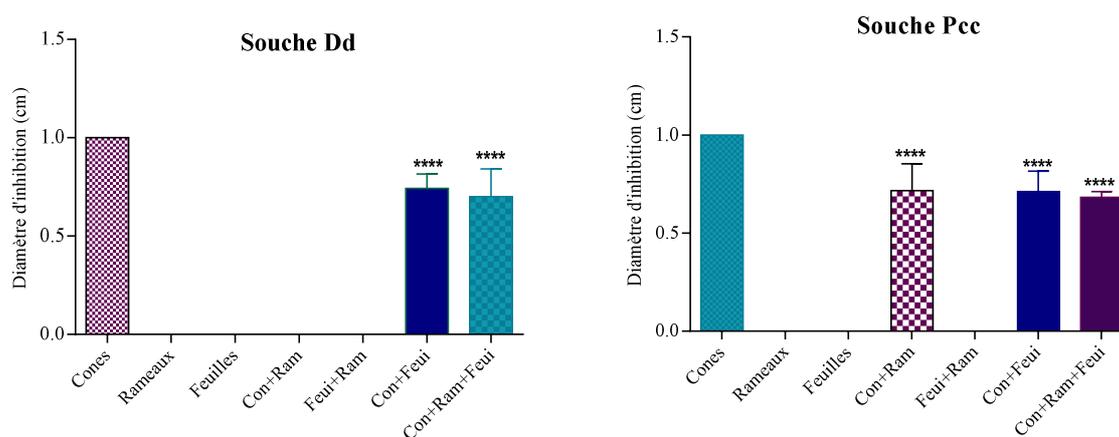


Figure 16 : Diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur les souches Dd et Pcc sous l'action des différents mélanges des HE de *P. nigra*

Sur les souches Dd et Pcc, uniquement les mélange d'huiles contenant la fraction Cônes dans leur composition ont donné un effet. On constate que les résultats obtenus sur les deux souches sont très proches, excepté pour l'huile cônes+rameaux qui n'a pas d'effet inhibiteur sur la souche Dd.

Les mélanges : cônes+feuilles ; cône + rameaux et cône + feuilles+rameaux, ont montré une activité antibactérienne faible sur lesdeux souches avec des diamètres d'inhibition inférieurs à 1 cm et significativement plus faible que le pure. Ce résultat signifie que les mélange donne un effet antagoniste sur les souches Dd et Pcc.

I.1.2. Détermination de la nature de l'activité (bactériostatique/ bactéricide)

Les résultats obtenus sur la nature de l'activité des HE testées à l'égard des souches ayant présentées des zones d'inhibition après la réalisation de l'aromatogramme, sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau IV : Nature de l'activité des huiles essentielles pures et leurs dilutions

Huile essentielle	Souches	observation	Type d'activité
Cônes pure	Ds, Dd et Pcc	Apparition de trouble	Bactériostatique
Cônes D1/2	Ds, Dd et Pcc	Apparition de trouble	Bactériostatique
Feuilles Pure	Ds	Apparition de trouble	Bactériostatique
Feuilles D1/2	Ds	Apparition de trouble	Bactériostatique
Rameaux pure	Ds	Apparition de trouble	Bactériostatique
Rameaux D1/2	Ds	Apparition de trouble	Bactériostatique

D'après les résultats on constate que les huiles de *Pinus nigra* ont un effet bactériostatique sur l'ensemble des souches gram négatif

I.1.3. Micro-atmosphère

La méthode micro-atmosphère nous a permis d'évaluer l'effet inhibiteur de la fraction volatiles des huiles. L'observation macroscopique de l'aspect de la croissance des bactéries testées, on constate que les souches Ds et Dd sont plus sensibles aux composés volatiles des HE que la souche Pcc qui semble être résistante.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pinus nigra* est peu étudiée, cependant sa composition chimique a été rapportée dans plusieurs études.

Plusieurs auteurs ont signalé que l' α -pinène, le germacrène D et le β -pinène étaient les composants dominants présents dans les HE de *Pinus nigra* (Adjaoud et al., 2022).

Fekih et al. (2014) ont étudié l'activité des huiles essentielles de *Pinus halepensis* sur les bactéries pathogènes (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*), ils ont suggéré dans leur étude que l'activité de l'HE serait dû à la présence des monoterpènes oxygénés qui constitue plus de 16,2% de l'HE. D'après l'étude menée par Schollenberger et al. (2021), l'HE de *Pinus silvestris* a une activité antibactérienne sur les souches *Pectobacterium carotovorum* et *Dickeya* spp. Diğark et al. (1999) ont étudié l'activité antimicrobienne des différentes parties de *Pinus nigra*, d'après leurs résultats les HE ont montré une activité sur toutes les bactéries testées, Cependant aucun effet n'a été observé sur les champignons. Une autre étude menée par Politéo et al. (2011) sur l'effet des HE de *Pinus nigra* sur le développement des microorganismes, d'après leurs résultats l'HE a montré des valeurs d'inhibitions variables. Les auteurs ont expliqué ces résultats par la composition des huiles et la sensibilité des souches testées. Leurs suggestions permettent d'expliquer les résultats obtenus dans notre étude sur les trois souches bactériennes.

Plusieurs études, notamment celles menées par Kaloustian et al. (2008) et Atilia et al. (2015) ont démontré que les HE sont plus actives sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives.

De même Nina Sadou et al. (2015) ont analysé la capacité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de *Pinus halepensis* sur les bactéries (gram + et gram -). Les auteurs ont constaté que l'HE testée était plus active vis-à-vis des bactéries Gram (+), que sur les bactéries Gram (-).

La résistance élevée des bactéries Gram (-) est attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipopolysaccharide. L'absence de cette barrière, chez les bactéries Gram (+) permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique (Sadou et *al.*, 2015). Cette différence entre les Gram positif et négatif, peut expliquer les résultats obtenus dans cette étude.

Les variations des résultats obtenus avec les mélanges d'huiles, pourrait être dues aux composés minoritaire et majoritaire actifs dont un effet synergique, additif ou antagoniste, la concentration de ces composés et la nature de sensibilité des souches *vis-à-vis* de ces différentes huiles. Les effets antimicrobiens des associations des huiles essentielles, sont définis selon trois interactions possibles :

- Synergie : l'effet des substances combinées est plus grand que la somme des différents effets.
- Addition : l'effet combiné est égal à la somme des différents effets,
- Antagonisme : l'effet de l'un ou des deux composés est moindre quand ils sont appliqués ensemble que quand ils sont individuellement appliqués(Burt,2004).

Une étude faite par Bullerman et *al.* (1977), sur la cannelle, rapporte que les composés majoritaires, montre une activité inhibitrice très forte sur la croissance d'*Aspergillus parasiticus*. Ces composés utilisés à des concentrations de 150 ppm et 125 ppm respectivement inhibent totalement la croissance de cette espèce, alors que l'huile essentielle complète ne le fait qu'à une concentration supérieure à 200 ppm. Les résultats de cette étude ont permis d'avancer l'hypothèse que les composés minoritaires joueraient un rôle dans l'activité des huiles essentielles. De ce fait, il est plus intéressant d'étudier une huile entière plutôt que certains de ses composants, parce que les concepts de synergie, d'antagonisme et d'addition semblent être plus significatifs (Bakkali et *al.*,2008).

I.1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats concernant la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles, à savoir l'extrait de cône pure ainsi que la synergie des trois extraits, sur les souches Ds, Dd et PCc, sont présentés dans le tableau ci-dessus :

Tableau V : Concentration minimale inhibitrice des trois deux HE en mg/ml

Huile	Souches	Témoin	Témoin	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
		-	+	2mg/ml	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml	0.0625mg/ml
Cônes pure	Ds	---	+++	---	---	---	---	---	---
		---	+++	---	---	---	---	---	---
		---	+++	---	---	---	---	---	---
Cônes + Rameaux + Feuilles	Ds	---	+++	---	---	---	---	---	---
		---	+++	---	---	---	---	---	---
		---	+++	---	---	---	---	---	---

- : Absence de croissance ; + : Présence de croissance Témoin - : BN+DMSO ; Témoin + : BN+DMSO+ Ds

D'après les résultats, on constate qu'il n'y a pas de croissance de la souche Ds traité par les deux HE (Cônes et Cônes+Rameaux+Feuilles) à toutes les concentrations testées, on peut alors affirmer que la concentration minimale inhibitrice de ces deux huiles est inférieure à 0,0625mg/ml.

I.1.5. Détermination de la concentration minimale Bactéricide (CMB)

D'après les résultats obtenus avec les deux huiles, il n'y a pas de croissance de la souche Ds, de la dilution 1 jusqu'à la dilution 3 (effet bactéricide), de ce fait la CMB des deux huiles testées est supérieure à 0.5mg/ml.

Dans une étude menée par Šarac et al. (2014), les auteurs ont rapporté que la CMI de l'huile *P. nigra* était inférieure à 20mg/ml. Mitric et al. (2018), ont rapporté que l'activité antimicrobienne de *Pinus nigra* nécessite des concentrations élevées. Selon Mouas et al. (2017), la grande résistance des Gram- est liée à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui constitue une membrane rigide et épaisse contrairement à la structure des Gram+.

Rosato et al. (2018) ont rapporté que l'huile essentielle *p. nigra* s'est avérée active sur plusieurs souches bactériennes, et que les CMI étaient variables d'une souche à une autre ; *S. aureus* (cmi=1.0 à 4.10 mg/ml) *E. coli* (Cmi=2.0mg/ml), *B. subtilis* (cmi=0.5mg/ml). Les auteurs rapportent que l'activité de cette huile est due à son composé principal qui est le α -pinène (49%). Ces variations entre ces résultats et ceux obtenus dans notre étude, peuvent être liées à la composition des huiles ou aux souches bactériennes utilisées.

I.2. Activité antifongique

I.2.1. Méthode de diffusion

Les résultats de l'activité des huiles pures et des dilutions D/2 testées sur les souches fongiques sont présentés dans la figure et le graphe suivants.



Figure 17 : Activité antifongique des HE sur les champignons

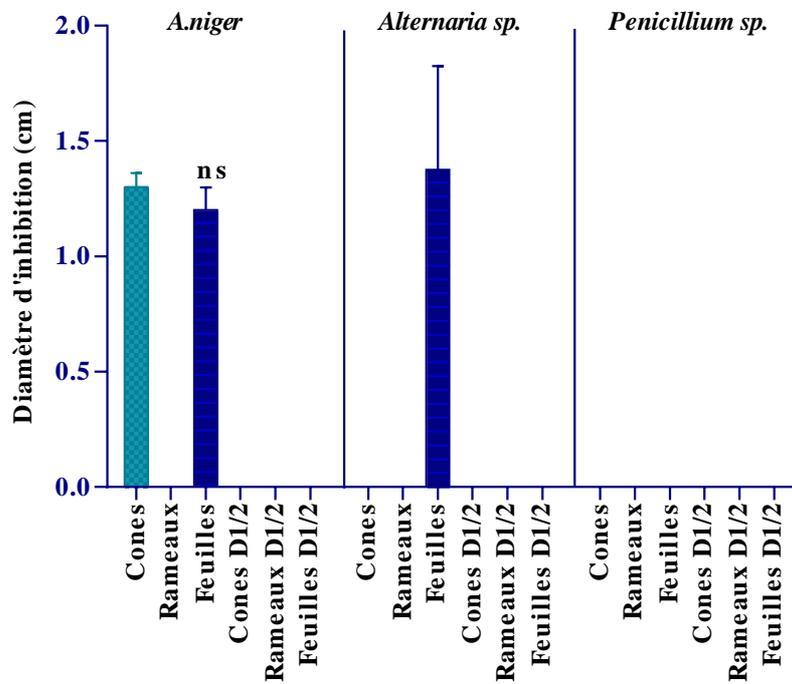


Figure 18 : Diamètres moyens des zones d'inhibition des champignons par les différentes huiles

D'après les résultats, l'HE cône a une activité uniquement sur *A. niger* (1.3 ± 0.06). L'HE feuilles à une activité antimicrobienne sur *A. niger* et sur *Alternaria* sp. avec des diamètres de $1.2 \pm 0,1$ cm et 1.16 ± 0.2 cm respectivement. *Penicillium* sp. s'est avéré résistant à toutes les huiles testées.

- **Teste de Synergie**

Les résultats du test de synergie, a montré que tous les mélanges sont inactifs sur les espèces fongiques testées. Ce résultat laisse suggérer que le mélange des huiles a donné naissance à de nouvelles formules inactives sur ces champignons.

1.2.2. Méthode de Micro-atmosphère

La figure et le graph ci-dessus représentent les résultats de l'activité des huiles essentielles sur les espèces fongiques par la méthode micro-atmosphère.

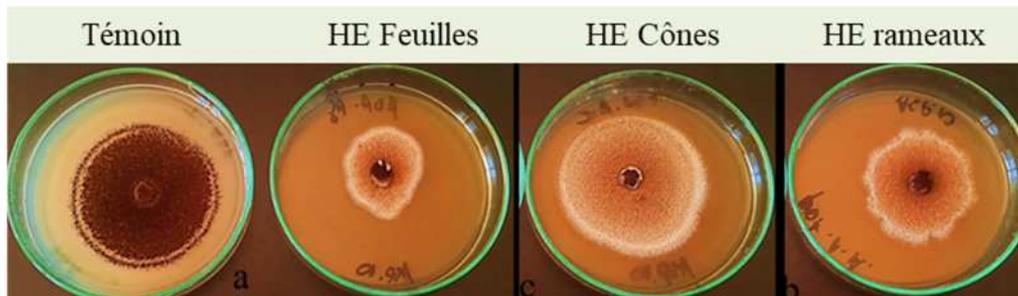


Figure 19 : Activité antifongique des HE sur *A. niger*.

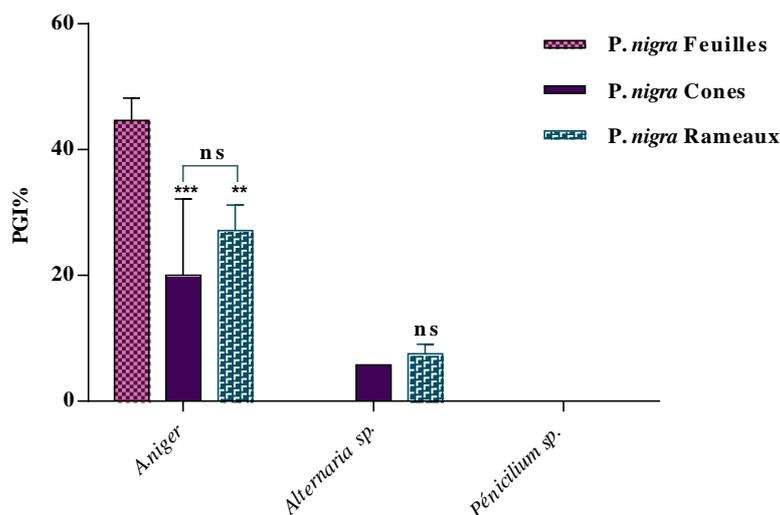


Figure 20 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne par les extraits purs de *P.nigra* par la méthode micro-atmosphère

D'après les résultats, l'HE feuilles à une activité remarquable sur *A. niger* avec un pourcentage d'inhibition de $44.64 \pm 3.53\%$, cependant sur *Alternaria* sp. et *Penicillium* sp. aucune activité n'a été enregistrée.

L'HE cônes a montré une activité moyenne et significativement ($p < 0.004$) inférieure à celle obtenue avec les feuilles sur *A. niger* ($19.99 \pm 12.12\%$), d'autre part, l'HE rameaux a montré une action modérée et significativement ($p < 0.018$) inférieure à celle obtenue avec les feuilles sur *A. niger* ($27.14 \pm 4.04\%$).

A l'égard de la souche *Alternaria* sp., les deux huiles Rameaux et Cônes ont donné des activités très faibles, $7.49 \pm 1.51\%$ et $5.71 \pm 0\%$ respectivement.

L'activité antifongique observée dans notre expérimentation peut être expliquée par la présence des monoterpènes avec un grand pourcentage selon les recherches menées par Adjaoud et al. (2022). De plus Sarac et al. (2014) ont montré que *A. niger* et deux d'autres souches bactériennes (*S.aureus* et *B.cereus*) sont sensibles aux huiles de *Pinus nigra* et toutes les plantes du genre *Pinus*.

L'absence de l'activité sur les espèces fongiques *Alternaria* sp. et *Penicillium* sp. peut être due à la composition chimique des fractions volatiles de l'HE où la quantité de l'HE utilisée. *Alternaria* sp. s'est avéré résistant à un volume de $20 \mu\text{l}$ de l'HE mais sensible à une quantité de $30 \mu\text{l}$ (Hmiri et al., 2011). Ce résultat permet d'expliquer les valeurs obtenues dans cette étude où la quantité de l'huile utilisée dans l'expérience de micro-atmosphère est $20 \mu\text{l}$.

D'après Adjaoud et al. (2022) Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les composés qui dominent dans la composition de *Pinus nigra*. Ces composés sont généralement considérés comme des substances volatiles à une faible activité qu'est due aux faibles liaisons hydrogènes ainsi leurs faibles solubilités dans l'eau (Sokovic et al., 2008)

Une autre étude menée par Koffi et al. (2013) sur l'effet de *O.basilicum* sur les espèces fongiques (*Alternaria* sp., *A. flavus*, *Biopolaris maydis*, *F. oxysporum*), ils ont trouvé que l'HE est inefficace sur la plupart des pathogènes testés et cette inactivité a été expliquée par la déférence des chémotypes testés.

En général l'efficacité de l'HE est liée étroitement à sa composition chimique, et elle peut varier en fonction de la partie de la plante et la méthode d'extraction. Selon Adjaoud et al. (2022) l'HE de la partie rameaux extraite par la micro-extraction en phase solide est très

riche en monoterpènes hydro-carburants (96.8%) et la partie feuilles en monoterpènes ; les sesquiterpènes hydro-carburants et les acides gras (42.4 ,12.5 et 43.1%) respectivement.

En revanche, l'HE rameaux et feuilles extraites par la méthode d'hydrodistillation contient plus de composé chimique, les rameaux contiennent : monoterpènes hydro-carburants, di-terpènes hydro-carburants, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes hydro-carburants, di-terpènes oxygénés et sesquiterpènes oxygénés (63.3 ;16.5 ;7.2 ;6.1 ;1.7 et 1.2%) et la partie feuilles contient : sesquiterpènes hydro-carburants, monoterpènes hydro-carburants, di-terpènes hydro-carburants et monoterpènes oxygénés (67.1 ;12 ;10.7 ;5.5 et 1.5%) respectivement.

Ghavam et al. (2020) ont montré que la majorité des HE peuvent traiter les infections antimicrobiennes et leur composition chimique est influencé par la partie de la plante utilisée ainsi que la méthode d'extraction. Selon Namshir et al. (2020), après l'analyse de la composition chimique, ils ont trouvé que l'HE de *Pinus silvestris* possède des propriétés antimicrobiennes qui varient en fonction de la partie de la plante et la méthode d'extraction.

II. Activité anti-inflammatoire

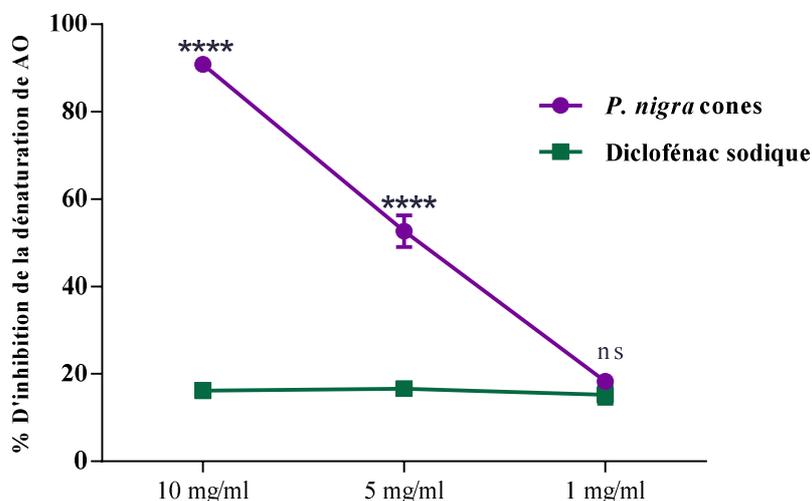


Figure 21 : Pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique par l'huile essentielle d'*P. nigra* et de diclofénac sodique

D'après le graphique on peut observer que l'huile de cône pure protège les protéines albumine d'œuf contre la dénaturation. À une concentration de 10 mg/ml, le pourcentage de protection est de $90.78 \pm 0\%$. À une concentration de 5 mg/ml, le pourcentage de protection

est de $52.63 \pm 6.22\%$, enfin, à une concentration de 1 mg/ml, le pourcentage de protection est de $18.31 \pm 2.67\%$.

En revanche, le diclofénac sodique offre une protection plus faible. À une concentration de 10 mg/ml, le pourcentage de protection est de $16.16 \pm 1.56\%$. À une concentration de 5 mg/ml, le pourcentage de protection est de $16.59 \pm 0.54\%$. Enfin, à une concentration de 1 mg/ml, le pourcentage de protection est de $15.21 \pm 3.50\%$.

D'après l'analyse du graphique, il est évident que plus la concentration de l'extrait diminue, plus la protection diminue. En d'autres termes, il existe une corrélation inverse entre la concentration de l'extrait et le niveau de protection observé. À mesure que la concentration diminue, la capacité de l'extrait à protéger les protéines contre la dénaturation diminue également.

Les HE sont connus depuis longtemps par leurs propriétés anti-inflammatoires parmi ces huiles celle de *Pinus nigra*. Selon l'étude menée par Sharma et al. (2020) sur l'activité biologique des huiles essentielles de *Pinus* spp. *in vitro*, les résultats de l'activité anti-inflammatoire ont montré que l'HE possède une forte capacité de protection des protéines de la dénaturation. L'étude menée par Tuman et al. (2011) sur l'activité anti-inflammatoire des HE des *Pinaceae* partie cône *in vivo*, ont montré que L'HE a une activité remarquable sur la cicatrisation de la plaie. Les auteurs ont rapporté que cet effet est dû à la composition chimique de l'HE qui est riche en monoterpènes.

Lina Karrat et al. (2020), ont rapporté que les extraits de *Pinus brutia* possèdent une activité anti-inflammatoire significative à des concentrations différentes par rapport au sodium diclofénac dans la dénaturation de l'albumine. En effet L'huile a montré une grande efficacité qui a atteint 55,38 % à 40 µg/ml, tandis que le sodium diclofénac n'a pas donné d'efficacité significative à cette concentration. Cependant des résultats remarquables à la concentration 120 et 160 µg/ml sont obtenus. Le composé principal de l'huile essentielle des feuilles de *Pinus brutia* était l' α -Terpineol, qui peut être à l'origine de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle.

D'autres études menées par Sharma et al. (2021) et Boukhatem et al. (2013) ont rapporté que les HE protègent les protéines de la dénaturation. Ceci est lié à l'inhibition d'une ou de plusieurs voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la synthèse de plusieurs médiateurs inflammatoires.

III. Teste d'activité antibactérienne des huiles sur *D. solani* ex vivo

Les résultats de ce teste nous ont permet de mettre en évidence l'activité de l'HE sur les phytopathogènes sur pomme de terre dans des conditions contrôlées au laboratoire.

Les figures ci-dessous représentent les résultats du test de l'effet antifongique des huiles.

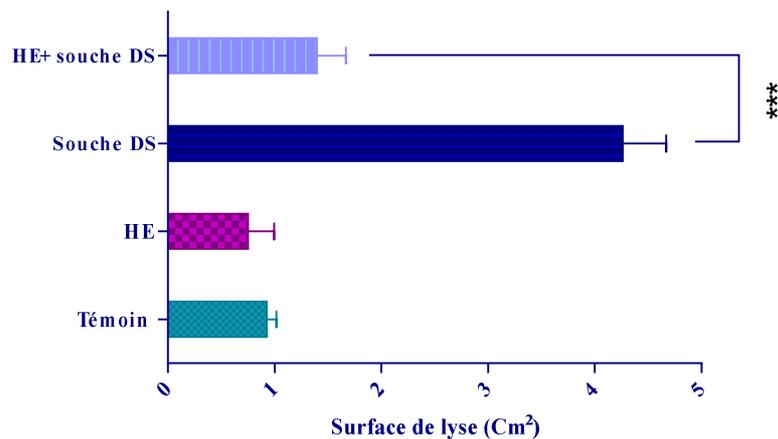


Figure22 : Les valeurs des surfaces de lyse obtenues sur des pommes de terre infectées par *D. solani* et traité par des huiles de *P. nigra*

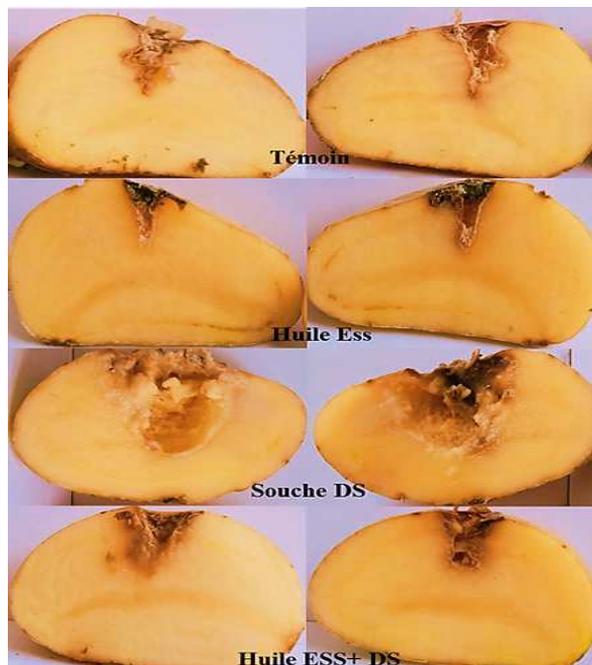


Figure 23 : Aspect des surfaces de lyse obtenues sur des pommes de terre infectées par *D. solani* et traité par des huiles de *P. nigra*

D'après les résultats on constate que la structure du tubercule de la pomme de terre non infectés est légèrement altérée, et d'après le graphe on observe que la surface d'altération est inférieures a 1 cm^2 . Ces résultats peuvent être dus aux conditions environnementale ou bien à l'oxydation de la structure après avoir provoqué la blessure.

Par la suite après avoir infecté les tubercules on a obtenu une zone de lise caractérisé par une pourriture mole, humide et visqueuse, la structure est devenue spongieuse avec un dégagement d'une odeur désagréable et des tache noir à la surface (figure 23). D'après le graphe on constate que la surface de lyse a atteint 4.26 cm^2 sur les tubercules infectés et non traités.

Sur les tubercules infectés après traitement avec l'huile essentielle (Cône +Rameaux+feuilles), on constate une réduction significative ($P < 0.0005$) de la zone d'altération jusqu'à atteindre une surface de 1.39 cm^2 . La zone d'altération est moins large et moins visqueuse. Un autre critère observé après traitement des tubercules c'est la diminution de l'intensité d'odeurs dégagé.

D'après les recherches menées par Toth et *al.* (2011), ils ont rapporté que *Dickeya* spp. Provoque de nombreuses maladies sur les plantes cultivées, et elles ont été déclarées pour la première fois sur la pomme de terre sur laquelle elles ont un pouvoir pathogène très élevé. Une autre étude menée par Czajkouski et *al.* (2013) rapporte que *Dickeya solanise* développe et se propage plus efficacement dans la pomme de terre, et elle capable de détériorer la structure des tubercules.

Alikhani et Garmakhany (2014) ont montré que le traitement des fruits de mangue en post-récolte avec les extraits de *Thymus vulgaris* L. et *Rosmarinus officinalis* L. ont réduit la pourriture ; prolonger la durée de stockage et préserver la qualité des fruits (Sharmeen et *al.*, 2020).

Selon Raveau et *al.* (2020), les huiles essentielles ont le potentiel de ciblé les microorganismes qui affecte les plantes pendant la culture ou pendant le stockage. Et selon Bajpai et *al.* (2010), les HE représentent des sources potentielles dans leurs applications en tant que bio-pesticide pour lutter contre les phytopathogènes

L'effet de l'HE utilisée dans notre expérimentation sur la souche Ds, peut être lié au plusieurs facteurs : la concentration de L'HE, la quantité inoculée, la méthode de traitement, le pouvoir pathogène de la souche, ainsi que les conditions environnementales.

Conclusion

Conclusion

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'activité antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire (in vitro) des huiles essentielles provenant de la plante aromatique : *Pinus nigra* ArlS sp. *mauritanica* Maire et Peyer (HE1: cône, HE2: rameaux, HE3: feuilles), obtenues par hydro-distillation et testées à l'état pur et à dilution 1/2, vis-à-vis de trois souches bactériennes (*Dickeya dantii*, *Dickeya solani*, *Pectobacterium carotovorum*) et de trois souches fongiques phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp, *Alternaria* sp).

En se basant sur les résultats de cette étude, on peut en conclure que la plante *Pinus nigra* présente une grande richesse en métabolites secondaires bioactifs. La plupart des bactéries et champignons phytopathogènes étudiés ont montré une sensibilité significative envers les huiles essentielles testées.

D'après les résultats l'HE cône pure présente une activité inhibitrice sur l'ensemble des souches bactériennes testées PCc, Dd et Ds tandis que les HE rameaux et feuilles pure avaient une activité uniquement sur la souche Ds.

Le test de synergie des huiles essentielle de *Pinus nigra* nous a permet de démontré que le mélange d'huiles montrent différents effets : synergique, additif et Antagoniste.

La concentration minimale inhibitrice de ces deux huiles est inferieur a 0,0625mg/ml et la CMB des deux huiles testées est supérieure à 0.5mg/ml.

Pour le test micro atmosphérique, on déduit que les huiles essentielles pure de cône, feuille, rameaux sont active sur l'espèce fongique *A.niger* et inactive sur *Alternaria* sp. et *Penicillium* sp..

Les résultats du test d'activité anti-inflammatoire, montre que l'huile cône pure protège les protéines albumine d'œuf contre la dénaturation (90% de protection à une concentration de 10mg/ml).

L'analyse statistique de l'activité antibactérienne in vivo a révélé un effet inhibiteur très significatif de l'huile essentielle (Cône +Rameaux+feuilles) contre la souche DS.

Ce travail a prouvé que les huiles essentielles de *P. nigra* peuvent être utilisées dans plusieurs domaines, notamment le domaine agricole, médical et agroalimentaire. Cependant, des études

complémentaires seront nécessaires afin de s'assurer de l'efficacité de ces huiles essentielles. Il serait intéressant :

- De déterminer les CMI des champignons ;
- De tester les huiles sur une large gamme de souches microbiennes ;
- D'étudier d'autres activités biologiques (antioxydante, antivirale, insecticide, antiparasitaire,...) ;
- Déterminer la composition chimique des huiles essentielles ainsi que l'effet de leurs principaux composants.

Références
Bibliographiques

• A

- Adelakun, O. E., Oyelade, O. J., & Olanipekun, B. F. (2016). Use of essential oils in food preservation. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 71-84). Academic Press.
- Adjaoud, A., Laouer, H., Braca, A., Cioni, P., Moussi, K., Berboucha-Rahmani, M., Abbaci, H., & Falconieri, D. (2022). Chemical composition, antioxidant and insecticidal activities of a new essential oil chemotype of *Pinus nigra* ssp. *mauritanica* (Pinaceae), Northern Algeria. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(2), 358-369.
- Alikhani, M., & Daraei Garmakhany, A. (2014). Effect of microencapsulated essential oils on the storage life of mango fruit (*Mangifera indica*. L, cv *Chaunsa*). *Minerva Biotecnologica*, 26 (Kupaei1), 49-55.
- Alonso-Gato M, Astray G, Mejuto JC, Simal-Gandara J. (2021). Essential Oils as Antimicrobials in Crop Protection. *Antibiotics*. 10(34). 1-12p.
- Aoshima, H. (2012). Beneficial effects of fragrances in beverages on human health. *Nutrition, well-being and health*, 119.
- Aouinty, B., Oufara, S., Mellouki, F., & Mahari, S. (2006). Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *BASE. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2), 67 – 71
- Atailia, I., & Djahoudi, A. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivé en Algérie. *Phytothérapie*, 13(3), 156-162.

• B

- Bajpai, V. K., Cho, M. J., & Kang, S. C. (2010). Control of plant pathogenic bacteria of *Xanthomonas* spp. by the essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu in vitro and in vivo. *Journal of Phytopathology*, 158(7-8), 479-486.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.

- Bendali, a., oulebsir, c., djamel, e. H., & djazouli, z. E. (2019) impact de la formulation sur le potentiel antifongique de l'huile essentielle du bigaradier *citrus aurantium l.*
- Berger, R. G. (Ed.). (2007). *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Science & Business Media.
- Botelho GR, Mendonca-Hagler LC. (2006). Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops - an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37, 401-416.
- Boukhatem, M. N., Hamaidi, M. S., 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 (Algérie). *Nature & Technology*, (3), 37.
- Boukhatem, M. N., Kameli, A., Ferhat, M. A., Saidi, F., & Mekarnia, M. (2013). Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. *Libyan Journal of Medicine*, 8(1).
- Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., & Chefrou, A. (2016). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85(2016), 174-189.
- Bullerman, LB, Lieu, FY et Seier, SA (1977). Inhibition de la croissance et de la production d'aflatoxines par les huiles de cannelle et de clou de girofle. Aldéhyde cinnamique et eugénol. *Journal of Food Science* , 42 (4), 1107-1109.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

• C

- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178-S180.
- Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013a). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 22-25.
- Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013b). Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 26-30.

- Czajkowski, R., De Boer, W. J., Van der Zouwen, P. S., Kastelein, P., Jafra, S., De Haan, E. G., & Van der Wolf, J. M. (2013). Virulence of 'Dickeyasolani' and *Dickeyadanthicola* biovar-1 and-7 strains on potato (*Solanumtuberosum*). *Plant Pathology*, 62(3), 597-610.
- D
- De Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016). Essential oils, part III: chemical composition. *Dermatitis*, 27(4), 161-169.
 - Dıǧrak, M., İlçim, A., & Hakkı Alma, M. (1999). Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicia*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 13(7), 584-587.
 - Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 7, 155-179. *in*. *Nutrition, well-being and health*. Bouayed, J., & Bohn, T. (Eds.). *BoD-Books on Demand*, 201. Edited by Jaouad Bouayed and Torsten Bohn. Janeza Trdine 9. 51000 Rijeka, Croatia. ISBN 978-953-51-0125-3
- E
- Farhin Khan, M., & Dwivedi, A. K. (2018). A review on techniques available for the extraction of essential oils from various plants. *International Research Journal of Engineering and Technology*, 5(5), 5-8.
 - Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., El Amine, M., & Costa, J. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), 97-103.
 - Faucon, M. (2012). *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale: fondements & aide à la prescription: monographies, huiles essentielles (HE), huiles végétales (HV), hydrolats aromatiques (HA)*. Médial.989. Editions sang de la terre .4,rue d'Alesia .75014 Paris
 - Filomena, N., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), <https://doi.org/10.3390/ph6121451>

• G

- Ghavam, M., Manca, M. L., Manconi, M., & Bacchetta, G. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Scientific reports*, 10(1), 15647.
- Gratton C., (2023). Processus dedistillation.
<https://www.christinegratton.ca/processus-de-distillation>. (consulté le 28 Mai 2023).

• H

- Hanif, M. A., Nisar, S., Khan, G. S., Mushtaq, Z., & Zubair, M. (2019). Essential oils. *Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production*, 3-17.
- Herzi, N., Bouajila, J., Camy, S., Cazaux, S., Romdhane, M., & Condoret, JS (2013). Comparaison entre extraction au CO₂ supercritique et hydrodistillation pour deux espèces d'eucalyptus : Rendement, composition chimique et activité antioxydante : deux espèces d'*eucalyptus*. *Journal of Food Science*, 78 (5), C667-C672..
- Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M., & El Ajjouri, M. (2011). Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Menthapulegium* et d'*Eucalyptus Camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège*.

• I

- ISO. (2021), International Organization for Standardization, *Matières premières aromatiques naturelles — Vocabulaire — Rectificatif technique 1, ISO/TC 54 Huiles essentielles. Edition 3.* <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:fr> (consulté le 31/05/2023).

• K

- Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée.* Springer.
- Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M. F. (2008). Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160-164.

- Karrat, L., Nayal, R., & Abajy, M. Y. (2020). Chemical composition of *Pinus brutia* Ten essential oil and its in vitro anti-inflammatory activity. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 21(24), 112-121
- Koffi, A. M., Tonzibo, Z. F., Delort, L., Ruiz, N., Caldefie-Chézet, L., & Chalchat, J. C. (2013). Corrélation entre la composition chimique et l'activité antifongique des huiles essentielles à prédominance thymol sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*. *Phytothérapie*, 11(2), 134-139.

• L

- Laouer H. (2004) -Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoidespusilla* et de *Magydarispastinacea*. Thèse de Doctorat d'état en écologie végétale, Université Ferhat Abbas, Faculté des sciences, Sétif, 146p.
- Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007a). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
- Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2007b). Les huiles essentielles: principes d'utilisation. *Kinesitherapie, la revue*, 61(7), 18-23.

• M

- Malik, S. (Ed.). (2019). *Essential oil research: Trends in biosynthesis, analytics, industrial applications and biotechnological production*. Springer.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.
- Mitić, Z. S., Jovanović, B., Jovanović, S. Č., Mihajilov-Krstev, T., Stojanović-Radić, Z. Z., Cvetković, V. J., ...& Stojanović, G. S. (2018). Comparative study of the essential oils of four *Pinus* species: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 111, 55-62.
- Mouas, Y., Benrebiha, F. Z., & Chaouia, C. (2017). évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *rosmarinus officinalis* L. *Revue Agrobiologia*, 7(1), 363-370.

• N

- Namshir, J., Shatar, A., Khandaa, O., Tserennadmid, R., Shiretorova, V. G., & Nguyen, M. C. (2020). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity on human

breast cancer cells of essential oil from *Pinussylvestris. varmongolica* needle. *Mongolian Journal of Chemistry*, 21(47), 19-26.

- Nea, F., Tanoh, E. A., Wognin, E. L., Kemene, T. K., Genva, M., Saive, M., ...&Fauconnier, M. L. (2019). A new chemotype of *Lantana rhodesiensis*Moldenke essential oil from Côte d'Ivoire: Chemical composition and biological activities. *Industrial Crops and Products*, 141, 111766.
- Nguyen, H. T., &Németh, Z. É. (2016). Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil. *Journal of appliedresearch on medicinal and aromatic plants*, 3(4), 143-150
- Ni, Z. J., Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Wei, Z. J. (2021). Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends in Food Science &Technology*, 110, 78-89.

• P

- Politeo, O., Skocibusic, M., Maravic, A., Ruscic, M., & Milos, M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of endemic Dalmatian black pine (*Pinusnigra* ssp. *dalmatica*). *Chemistry&biodiversity*, 8(3), 540-547.
- Ponce AG, Fritz R, del Valle CE et Roura SI. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaftund – Technologie*. 36, 679-684p
- Price, S. (1998). Using essential oils in professional practice. *ComplementaryTherapies in Nursing and Midwifery*, 4(5), 144-147.

• R

- Raut, J. S., &Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrialcrops and products*, 62, 250-264.
- Raveau, R., Fontaine, J., &Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2020). Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A review. *Foods*, 9(3), 365.
- Rosato, A., Maggi, F., Cianfaglione, K., Conti, F., Ciaschetti, G., Rakotosaona, R., &Corbo, F. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of seven uncommon essential oils. *Journal of EssEntialoilrEsEarch*, 30(4), 233-243.

• S

- Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadeif, Y. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord est Algérien. Synthèse:Revue des Sciences et de la Technologie, 30, 33-39
- Šarac, Z., Matejić, J. S., Stojanović-Radić, Z. Z., Veselinović, J. B., Džamić, A. M., Bojović, S., & Marin, P. D. (2014). Biological activity of *Pinus nigra* terpenes— evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. Computers in biology and medicine, 54, 72-78.
- Schollenberger, M., Gadowska-Gajadhur, A., Mirzwa-Mróz, E., Kret, D., Skutnik, E., Paduch-Cichal, E., & Gleason, M. (2021). The influence of plant essential oils on in vitro growth of *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. bacteria. ScientiarumPolonorumHortorumCultus, 20(6), 19-29
- Sharma, A. D., Farmaha, M., Kaur, I., & Singh, N. (2021). Phytochemical analysis using GC-FID, FPLC fingerprinting, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activities analysis of traditionally used *Eucalyptus globulus* essential oil. Drug AnalyticalResearch, 5(1), 26-38.
- Sharma, A., Sharma, L., & Goyal, R. (2020). GC/MS Characterization, in-vitro antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity of essential oils from *Pinus* plant species from Himachal Pradesh, India. Journal of Essential OilBearing Plants, 23(3), 522-531.
- Sharmeen, F., Saikat, M. M. H., Ahmed, J. U., Islam, M. T., & Islam, A. A. (2022). Parent selection for hybridization in chilli (*Capsicum annuum* L.) using multivariate analysis and K-means clustering. Fundamental and Applied Agriculture, 7(4), 327-335.
- Sokovic, M., Marin, P. D., Brkic, D., & van Griensven, L. J. (2008). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils against human pathogenic bacteria. Food, 1(2), 220-226.
- Sovová, H., & Aleksovski, S. A. (2006). Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. Flavour and Fragrance Journal, 21(6),
- Svoboda KP et Svoboda TG. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants. A review and Atlas of micrographs. Edition: Microscopix Publications, 61p.

- Szczerbanik, M., Jobling, J., Morris, S., &Holford, P. (2007). Essential oil vapours control some common postharvest fungal pathogens. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 47(1), 103-109.

- T

- Teresa-Martínez, G. D., Cardador-Martínez, A., Téllez-Pérez, C., Allaf, K., Jiménez-Martínez, C., & Alonzo-Macías, M. (2022). Effect of the instant controlled pressure drop technology in cardamom (*Elettariacardamomum*) essential oil extraction and antioxidant activity. *Molecules*, 27(11), 3433.
- Toth, I. K., Van Der Wolf, J. M., Saddler, G., LOjkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., &Elphinstone, J. G. (2011). Dickeya species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant pathology*, 60(3), 385-399.
- Tumen, I., Akkol, E. K., Süntar, I., &Keleş, H. (2011). Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: preclinical experimental research in animal models. *Journal of ethnopharmacology*, 137(3), 1215-1220.

- Z

- Zouari, N. (2013). Essential oils chemotypes: A less known side. *Med Aromat Plants*, 2(2), e145.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture (pour un litre)**• Bouillon nutritif (Liofilchemsrl)**

Extrait de bœuf	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorite de sodium	5 g
pH	6.8 ± 0.2
T° et Tps d'autoclavage.....	121°C/15min

• Milieu MH (Gélose de Mueller Hinton)

Acide hydrolysate de caséine	17.5 g
Agar	17 g
Amidon soluble	1.5 g
Extrait de viande	2 g
pH	7.3 ± 0.2
T° et Tps d'autoclavage.....	121°C/15min

• Milieu PCA (plate count agar) (TM MEDIA)

Agar	9 g
Dextrose	1 g
Tryptone	5 g
Extrait de levure	2.5 g
pH	7 ± 0.2
T° et Tps d'autoclavage.....	121°C/15min

• **Milieu PDA (Potato dextrose agar) (BIOCHEM)**

Agar	15g
Dextrose	20 g
Filtrat pommes de terre	200g
pH	6.8 ±0.2
T° et Tps d'autoclavage.....	121°C/15min

• **Milieu TSA (Liofilchem)**

Agar	15g
Digestion pancréatique de caséine	17g
Digestion papaique de soja	3g
Chlorure de sodium	5g
Hydrogénophosphatedipotassique.....	2.5g
Glucose monohydraté.....	2.5g
pH	7 ± 0.2
T° et Tps d'autoclavage.....	121°C/15min

Annexe II : Composition de la solution du tempo phosphate.

Eaux distillé.....	1L
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄).....	36.33 g
Phosphate de potassium dibasique (K ₂ HPO ₄).....	23.125 g
pH.....	6.3 ± 0.2

Annexe III : matériel végétal (*Pinus nigra*)**1. Classification botanique (Farjon, 2018)**

- Règne Pinophyta
- Phylum Cycadophyta
- Classe Ginkgophyta
- Famille Pinaceae
- Genre *Pinus*
- Espèce *Pinus nigra*
- Sous espèces *mauritanica*
- Nom commun Pin noir

2. Description

Pinus nigra connu sous le nom "pin noir" est un arbre pouvant atteindre une hauteur de 50m. Il est généralement droit et recouvert d'une écorce de couleur gris clair ou gris brun foncé. Au fur et à mesure qu'ils vieillissent, les jeunes cônes adoptent une forme semblable à un parapluie, les rameaux sont légèrement ascendants et les feuilles étant plutôt rigides, droites ou légèrement courbées (Isajev et al., 2003).

3. Récolte

Les parties aériennes de *Pinus nigra* ssp. *mauritanica* ont été récoltées dans le parc national du Djurdjura à une altitude de 1521 m (36° 27' 09" N, 004° 06' 26" E) dans le nord de l'Algérie. Elles sont collectées pendant la floraison, puis séchées à l'ombre pendant 15 jours.

Résumé

Ce travail avait pour but d'évaluer l'activité antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire de trois huiles essentielles extraites de différentes parties de *Pinus nigra* (cône, rameaux et feuilles). L'activité antibactérienne de l'huile (Cones+rameaux+feuilles) sur les pommes de terre a été également réalisée. Les résultats obtenus ont révélé que l'HE de cône de *Pinus nigra* possède un pouvoir antimicrobien intéressant sur toutes les souches bactériennes testées (*Dickeya dadantii* ; *Dickeya solani* ; *Pectobacterium carotovorum*) et sur une seule espèce fongique (*Aspergillus niger*). Tandis que les deux huiles essentielles des rameaux et feuilles possèdent une activité antimicrobienne moyenne. Cependant la combinaison des trois huiles essentielles a donné une activité antibactérienne synergique *vis à vis* de toutes les souches testées. La concentration minimale inhibitrice de l'huile de cône et du mélange des huiles essentielles est $<0.0625\text{mg/ml}$ et la CMB est $> 0.5\text{mg/ml}$ sur *Dickeya solani*. Le teste anti-inflammatoire a révélé que HE a un pouvoir remarquable sur la protection de la protéine albumine d'œuf. Le test *ex vivo* a décelé une activité inhibitrice significative contre la souche bactérienne *Dickeya solani*.

Mots clés : Huiles essentielles ; *Pinus nigra*; Activité antimicrobienne ; Activité antiinflammatoire ; *Dickeya solani*.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the antibacterial, antifungal and anti-inflammatory activity of three essential oils extracted from different parts of *Pinus nigra* (cone, twigs and leaves). Antibacterial activity of essential oil (cone+twigs+leaves) was carried out on potato. The results showed that *Pinus nigra* cone EO had interesting antimicrobial properties on all bacterial strains (*Dickeya dadantii*; *Dickeya solani*; *Pectobacterium carotovorum*) and on just one fungal species (*Aspergillus niger*). While the two essential oils from the twigs and leaves had average antimicrobial activity. However, the combination of the three essential oils gave a synergistic antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration of cone oil and the mixture of essential oils is $<0.0625\text{mg/ml}$ and BMC $> 0.5\text{mg/ml}$ on *Dickeya solani*, these depend on the EO used as well as the strains tested. The anti-inflammatory test revealed that EO has a remarkable power to protect egg albumin protein. The *ex vivo* test revealed significant inhibitory activity against the bacterial strain *Dickeya solani*.

Key words: Essential oils; *Pinus nigra*; Antimicrobial activity; Anti-inflammatory activity; *Dickeya solani*.