HAL
open science

# Caractérisation des huiles essentielles de Tetraclinis articulata (Vahl) Masters (Thuya de Barbarie) de la région de Tlemcen et étude de leurs activités biologiques

Maghnia Boussaid

▶ **To cite this version:**

Maghnia Boussaid. Caractérisation des huiles essentielles de Tetraclinis articulata (Vahl) Masters (Thuya de Barbarie) de la région de Tlemcen et étude de leurs activités biologiques. Sciences du Vivant [q-bio]. UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEN, 2017. Français. NNT : . tel-02522997

**HAL Id: tel-02522997**

**https://hal.science/tel-02522997v1**

Submitted on 28 Mar 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID-TLEMCEN**

***Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la terre et de l'Univers***
***Département de Biologie***
**Laboratoire des « Produits Naturels »**

**Laboratoire de l'équipe « Chimie & Biomasse » de l'Université de Corse**

# THÈSE

**En vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT**
**En Biologie**
**Option : Produits Naturels, Aspects Nutritionnels et Activités Biologiques**

Présentée par : **M^lle^ BOUSSAID Maghnia**

## Thème

**Caractérisation des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Thuya de Barbarie) de la région de Tlemcen et étude de leurs activités biologiques**

**Soutenue le :** 02 Mai 2017

**Devant le jury composé de :**

**Président :**
**M. CHABANE SARI Daoudi** — **Professeur** à l'Université de Tlemcen

**Examinateurs :**
**M. CASANOVA Joseph** — **Professeur** à l'Université de Corse
**Me ATIK BEKKARA Fewzia** — **Professeur** à l'Université de Tlemcen
**M. ABDELOUAHID Djamel Eddine** — **Professeur** à l'Université de Tlemcen

**Directeur de thèse :**
**Me BEKHECHI Chahrazed** — **Professeur** à l'Université de Tlemcen

**Co-directeur de thèse :**
**M. TOMI Félix** — **Professeur** à l'Université de Corse

**Année Universitaire : 2016-2017**

# Remerciements

***L*ouange à ALLAH**, nous le glorifions, lui demandons aide et invoquons son pardon contre le mal de nos péchés, celui qui fut guidé, personne ne peut l'égarer et celui qui est égaré, personne ne peut le guider. Je témoigne qu'il n'y a point de divinité digne d'adoration sauf ALLAH, l'Unique, qui n'a point d'associé.

***C***e travail a été réalisé au Département de Biologie, laboratoire de « Produits Naturels », au sein de l'équipe « Activité Antimicrobiennes des Plantes Médicinales et Ecologie Microbienne», sous la direction de Madame **BEKHECHI Chahrazed,** en collaboration avec le laboratoire de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse, sous la direction de Monsieur **TOMI Félix**.

***T***out d'abord, je tiens à remercier du fond du cœur, mon directeur de thèse Madame **BEKHECHI Chahrazed**, Professeur à l'université de Tlemcen, que j'estime énormément. J'ai beaucoup apprécié ses qualités d'enseignant et d'encadrement. J'aimerais lui adresser mes plus vifs remerciements pour l'attention qu'elle a portée à cette thèse, pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée, son soutien, ses conseils, sa gentillesse, sa disponibilité et sa rigueur dans le travail qui est un des éléments majeurs du bon déroulement de cette thèse. J'ai eu le privilège de bénéficier de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.

***J***e suis également sensible à l'honneur que me fait Monsieur **TOMI Félix**, Professeur à l'université de Corse, en acceptant d'être le Co-directeur de ce travail. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance, il m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. En effet, il a mis à notre disposition l'ensemble des moyens analytiques disponible dans son laboratoire et en particulier la technique d'analyse des mélanges naturels par RMN du carbone-13 mise au point et développée par l'équipe « Chimie & Biomasse » de l'université de Corse. Je vous remercie également pour votre aide concernant la rédaction et la soumission des articles. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

***J***e tiens également à remercier Monsieur **CHABANE SARI Daoudi,** Professeur à l'université de Tlemcen, directeur du laboratoire des « Produits Naturels », pour sa disponibilité et ses encouragements pour accomplir ce travail. Vous me faites un très grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse. Je vous prie de bien croire à ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance.

***J***e profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur **CASANOVA Joseph**, Professeur émérite à l'université de Corse, d'avoir accepté de juger ce travail. Vos remarques et suggestions Monsieur seront de grandes valeurs pour enrichir cette thèse. Je vous remercie également pour votre aide précieuse concernant la rédaction des publications.

***L***e mot « merci » est bien court pour exprimer ma profonde reconnaissance à Madame **ATIK BEKKARA Fewzia**, Professeur à l'université de Tlemcen, pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein du son laboratoire, pour m'avoir encouragée. Ses compétences sont inestimables pour moi. Merci pour votre qualité humaine, votre soutien tout au long de ce travail, et l'honneur que vous me faite en acceptant de juger ce travail.

***J***e veux exprimer, ma respectueuse gratitude à Monsieur **ABDELOUAHID Djamel Eddine,** Professeur à l'université de Tlemcen, pour avoir bien voulu participer à ce jury. Je suis très heureuse de bénéficier de ses recommandations et je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

***J***'exprime aussi ma reconnaissance à Monsieur **BOUAZZA Mohammed**, Professeur à l'université de Tlemcen, pour ses conseils et pour son aide concernant l'identification de la plante étudiée.

***M***es remerciements s'adressent à Monsieur **BIGHELLI Ange,** Professeur à l'université de corse et Monsieur **PAOLI Mathieu,** Ingénieur de recherche à l'université de Corse, pour leurs aides dans les analyses de nos échantillons et l'étude statistique de la composition chimique des huiles essentielles.

***Q***ue les responsables de directions des forêts : Monsieur **RAMDANI Mohammed** (Sabra), Monsieur **BENHAMMOU Mustapha** et son adjoint Monsieur **HASNAOUI Mustapha** (Sebdou) et Monsieur **ZAIR Abdelkader** (Ouled Mimoun) de la wilaya de Tlemcen trouvent ici l'expression de ma gratitude pour avoir participé à la récolte et pour l'aide apportée lors de l'échantillonnage du *Tetraclinis articulata.* Merci pour m'avoir orientée et guidée sur terrain.

***J***e veux faire part aussi de toute ma gratitude à **M$^{lle}$ BEDDOU Fawzia**, **M$^{r}$ EL-HACI Imad Abdelhamid**, **M$^{lle}$ AISSAOUI Ghania** et **M$^{lle}$ BOUKLIKHA Asma** qui ont contribués à ma formation en partageant toutes leurs connaissances pendant la période où nous avons travaillé ensemble.

***J***'ai eu le plaisir de connaître, au laboratoire des Produits Naturels, la compagnie fraternelle et amicale de tous les membres de nos unités. J'exprime ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin à accomplir ce modeste travail.

***J***e tiens à remercier infiniment mon père, qui m’a aidée pour la récolte de la plante. Je te dédie ce travail qui est aussi le tiens, tu as été pour beaucoup dans sa réalisation et qu'il soit pour toi un modeste témoignage de mon indéfectible attachement et mon amour éternel.

***J’***adresse aussi mes remerciements à mes frères, mes sœurs et mes amies, pour leur patience, leurs encouragements, et leur soutien sans faille et permanent. Je profite de l’occasion qui m’est ainsi donnée pour leur faire part de mon profond attachement et les assurer de toute mon affection.

***À*** la mémoire de ma mère que Dieu repose son âme en paix, je lui dédie ce travail.

# *Résumé*

Dans le but de valoriser les plantes médicinales algériennes, nous sommes intéressés dans ce mémoire d'une part, à la caractérisation chimique par CPG (Ir), CPG-SM et RMN du $^{13}C$ des huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes et des cônes de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Thuya), poussant spontanément dans la région de Tlemcen, et d'autre part, à la détermination des activités biologiques de ces huiles essentielles.

La première partie concerne la caractérisation chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* prélevées dans huit stations de la région de Tlemcen. Les teneurs en huile essentielle sont très variables. Les cônes (0,17-1,13%) sont plus riches en huiles essentielles que les parties aériennes (feuilles et fleurs), de 0,03 à 0,86%. L'analyse détaillée de l'huile essentielle des parties aériennes, par combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques, a permis d'identifier 35 composés. Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes ; l'α-pinène (23,6%), l'acétate de bornyle (20,7%) et le camphre (17,3%) étant les composés majoritaires. L'analyse de 50 échantillons d'huile essentielle des parties aériennes, associée à un traitement statistique des données (PCA, dendrogramme) a permis de mettre en évidence une variabilité chimique. Ainsi, les échantillons se répartissent en deux principaux groupes (I et II lui-même subdivisé en deux sous-groupes) selon les teneurs en camphre (groupe I), en α-pinène (sous-groupe IIA) et en α-pinène/acétate de bornyle (sous-groupe IIB). En parallèle, nous avons suivi la composition chimique des huiles essentielles des feuilles récoltées sur un même pied au cours d'une année et constaté que les rendements en huile essentielle varient d'un mois à un autre (0,16 à 0,66%) avec les valeurs les plus importantes observées pour les mois de juin et de décembre. La composition demeure qualitativement homogène mais présente des différences quantitatives. Cette variabilité concerne les composés majoritaires, à savoir : α-pinène (11,1-24,6%), acétate de bornyle (8,6-41,1%) et camphre (2,2-16,4%). Nous avons poursuivi nos travaux par la détermination de la composition chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata* prélevés dans les mêmes stations. L'analyse détaillée de six échantillons d'huile essentielle de cônes a permis d'identifier 38 composés, dont la composition chimique est dominée par l'α-pinène (47,1-73,6%), le limonène (6,5-21,9%) et le myrcène (jusqu'à 11,6%). L'analyse de 40 échantillons de cônes, avec la combinaison des résultats statistiques a permis de mettre en évidence une variabilité chimique. Ainsi, les échantillons se répartissent en deux principaux groupes caractérisés par l'α-pinène (groupe I) et l'association α-pinène/limonène (groupe II).

La deuxième partie a été consacrée à l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de ces huiles essentielles. Les huiles essentielles des parties aériennes de *Tetraclinis articulata* présentant trois compositions chimiques différentes (α-pinène ou camphre ou acétate de bornyle majoritaire), agissent de façon très active contre les deux souches de *Staphylococcus aureus* et contre *Aspergillus fumigatus*, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 20 et 38,5 mm. L'huile essentielle à camphre majoritaire s'est avérée la plus intéressante, avec des CMIs variant entre 1 et 3 µL/mL tandis que celle à α-pinène présente la moins bonne efficacité avec des CMIs variant entre 2 et 6 µL/mL, vis-à-vis des mêmes micro-organismes. Enfin, nous avons testé l'activité antioxydante avec trois méthodes : DPPH, *β*-carotène et FRAP, vis-à-vis de trois échantillons d'huile essentielle des parties aériennes et de douze échantillons de cônes présentant trois compositions chimiques différentes, en fonction des pourcentages d'α-pinène et de limonène. Les résultats obtenus ont révélé une faible activité antioxydante pour l'ensemble des huiles essentielles par comparaison aux composés de référence.



**Mots clés :** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, huile essentielle, CPG (Ir), CPG-SM et RMN du $^{13}C$, activité antimicrobienne, CMI, activité antioxydante.

# Abstract

In order to promote Algerian medicinal plants, we were interested in this work by the chemical characterization by CG (Ir), CG-SM and $^{13}C$ NMR of the essential oils obtained from the aerial parts as well as the cone of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Barbary Thuya), growing in a spontaneous state in the region of Tlemcen on one hand, and the determination of the biological activities of these essential oils on the other hand.

The first part concerned the chemical characterization of the essential oil of *Tetraclinis articulata* brought to Tlemcen in eight stations. The essential oil yields are very variable. The cone (0.17-1.13%) are rich in essential oils than the aerial parts (leaves and flowers), from 0.03 to 0.86%. A detailed analysis of aerial parts essential oil, using the combination of chromatographic and spectroscopic techniques, leads to the identification of 35 compounds. This essential oil is rich in monoterpens which α-pinene (23.6%), bornyl acetate (20.7%) and the camphor (17.3%) being the main constituents. The analysis of 50 samples of aerial parts essential oil, associated with statistical treatment of the results (PCA and Dendrogram), suggested the occurrence of a chemical variability. Samples are divided into two groups (I and II which is subdivided in two sub-groups) based on their contents in camphor (groupe I), in α-pinene (sub-groups IIA) and in association α-pinene/bornyl acetate (sub-groups IIB). In parallel, we followed the chemical composition of leaves essential oils collected on the same foot during one year and noted that the essential oil yields varied from one month to another, ranging between (0.16 à 0.66%) with the most important values observed for December and June. The composition remains qualitatively homogeneous but present quantitative differences. This variability also concerned to major compounds, namely: α-pinene (11.1-24.6%), bornyl acetate (8.6-411%) and camphor (2.2-16.4%). We continued our work by the determination of the chemical composition of the cone essential oils of *Tetraclinis articulata* isolated from the same stations. A detailed analysis of six samples of the cone's essential oil leads to the identification of 38 compounds, of which the chemical composition are dominated by the α-pinene (47.1-73.6%), limonene (6.5-21.9%) and myrcene (up to 11.6%). The analysis of 40 samples of the cone's essential oil, associated with statistical treatment, suggested the occurrence of a chemical variability. Thus, samples are divided into two independent groups characterized by α-pinene (group I) and association α-pinene/limonene (group II).

The second part concerned the study of the antimicrobial and antioxidant activity of these essential oils. Essential oils of the aerial parts of *Tetraclinis articulata* presenting three different chemical compositions (α-pinene, or camphor or bornyl acetate majority), displayed the highest activity against both *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus fumigatus*, with diameters of the zones of inhibition ranging between 20 and 38.5 mm. However, essential oil with camphor as major component was the most interesting, with CMIs ranging between 1 and 3 µL/mL. While, essential oil with α-pinene remains the less effective, with CMIs ranging between 2 and 6 µL/mL, against to the same micro-organisms. Finally, we tested the antioxidant activity with three methods: DPPH, β-carotene and FRAP, with respect to three samples of essential oil of the aerial parts and twelve of cones exhibiting three different chemical compositions, according to the percentages of α-pinene and limonene. The results obtained revealed a weak antioxidant capacity for the whole essential oils by comparison with the reference compounds.



**Keywords:** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, essential oil, GC (Ir), GC-MS, and $^{13}C$ NMR, antimicrobial activity, MIC, antioxidant activity.

# الملخـص


بهدف تثمين النباتات الطبية في الجزائر،ركزنا اهتمامنا في هذه المذكرة ، أولا إلى تمييز التركيبة الكيميائية للزيوت العطرية للأجزاء الهوائية ولثمار نبتة *Tetraclinis articulata* (Vahl) Master (Thuya)(العرعار) التي تنمو تلقائيا في منطقة تلمسان، وذلك بواسطة التحليل الكروماتوغرافي الغازي CPG(Ir) و التحليل الكروماتوغرافي الغازي / قياس الطيف الكتلي (CPG-SM) ، بالإضافة إلى التحليل النووي المغناطيسي للكربون 13 (RMN du $^{13}$C)، ومن ناحية أخرى إلى دراسة القدرة البيولوجية لهذه الزيوت العطرية.

الجزء الأول يتعلق بدراسة الخواص الكيميائية للزيوت العطرية لنبتة *Tetraclinis articulata* و التي تم جمعها من ثماني محطات في منطقة تلمسان. مردودات الزيوت العطرية تختلف اختلافا كبيرا. الثمار(0,17 إلى 1,13٪)غنية جدا بالزيت العطري مقارنة بالأجزاء الهوائية (الأوراق والزهور) ، والتي تتراوح ما بين 0,03 إلى 0,86٪. التحليل المفصل للزيت العطري للأجزاء الهوائية عن طريق الجمع بين التقنيتين الكروماتوغرافية و الطيفية، كشف عن 35 مركبا كيميائيا. هذه الزيت غنية جدا بأحادي التربان من بينها α-بينين (23,6٪)،اسيتات البورنيل (20,7٪) والكافور (17,3٪) كمركبات رئيسية. ساعد التحليل الكيميائي ل 50 عينة من الزيت العطري للأجزاء الهوائية، جنبا إلى جنب مع تحليل البيانات الإحصائية (PCA، dendrogramme) إلى تسليط الضوء على التغير الكيميائي. وبالتالي، يتم تقسيم العينات إلى مجموعتين رئيسيتين (I و II، والتي تنقسم بدورها إلى مجموعتين فرعيتين) وذلك وفقا لمحتوى الكافور (المجموعة I)، α-بينين (المجموعة الفرعية IIA) وα-بينين / اسيتات البورنيل (المجموعة الفرعية IIB). بالموازاة مع ذلك، قمنا بمتابعة التركيبة الكيميائية للزيوت العطرية للأوراق المحصل عليها من نفس القدم على مدار السنة. فأثبتنا أن مردود الزيت يختلف من شهر إلى آخر (0,16 إلى 0,66٪)، مع اكبر مردود كان في شهري جوان وديسمبر. التركيبة الكيميائية متجانسة نوعيا ولكن مختلفة كميا، ويتعلق هذا التباين بالمركبات الرئيسية: α-بينين (11,1-24,6٪)، اسيتات البورنيل (8,6 إلى 41,1٪) والكافور (2,2 إلى 16,4٪). لقد تابعنا بحثنا هذا أيضا بتحديد التركيبة الكيميائية للزيوت العطرية لثمار *Tetraclinis articulata* والتي تم جمعها من نفس محطات الأجزاء الهوائية. التحليل المفصل لست عينات من الزيوت العطرية للثمار كشف عن 38 مركبا والتي يهيمن عليها: α-بينين (47,1-73,6٪)، الليمونين (6,5-21,9٪) وميرسين (تصل نسبته إلى 11,6٪). ساعد تحليل 40 عينة من الثمار، مع نتائج البيانات الإحصائية إلى تسليط الضوء على التغير الكيميائي. وبالتالي، تنقسم العينات إلى مجموعتين رئيسيتين تتميزان ب α-بينين (المجموعة I) والى مصاحبة α-بينين لليمونين (المجموعة II).

وخصص الجزء الثاني لدراسة فعالية هذه الزيوت كمضادات للميكروبات و للأكسدة. الزيوت العطرية ل*Tetraclinis articulata* والتي تتميزبثلاث تراكيب كيميائية مختلفة (α-بينين، كافور، اسيتات البورنيل)، أظهرت نشاط جد فعال في محاربة صنفي البكتيريا العنقودية *Staphylococcus aureus* والفطر *Aspergillus fumigatus* *مع أقطار تثبيط تراوح قطرها ما بين*20 و 38,5 ملم. لقد اثبت أن الزيت العطري الغني بمركب الكافور هو الأكثر فعالية مع قيم التركيز الأدنى للتثبيط (CMIs) متراوحة ما بين 1و3 ميكرولتر/ملل، بينما الزيت الغني بα-بينين تبين أنه الأقل نشاطا مع قيم CMIs متراوحة مابين 2 و6 ميكرولتر/ملل ضد نفس الميكروبات. ثم قمنا في الأخير بدراسة النشاط المضاد للأكسدة باستخدام ثلاث طرق:تثبيط الجدر الحرDPPH،تثبيط تلون البيتاكاروتين،وارجاع الحديد للزيوت العطرية الثلاثة للأجزاء الهوائية ولاثني عشر عينة من الثمار مختارة تتميز بثلاثة أنواع كيميائية مختلفة (حسب النسب المئوية لαα-بينين والليمونين). وأظهرت النتائج وجود قوة مضادة للأكسدة منخفضة لجميع الزيوت الأساسية مقارنة مع المركبات المرجعية.



**الكلمات المفتاحية :** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, الزيت العطري، CPG(Ir)، CPG-SM و RMN ل $^{13}$C، القدرة المضادة للميكروبات، التركيز الأدنى المثبط، القدرة المضادة للأكسدة.

**TABLE DES MATIERES**

Remerciements

Résumé

Abstract

الملخص

Table des matières

Tables des illustrations

**Introduction** ..... **1**

Introduction ..... **2**

**1ème partie : Synthèse bibliographique** ..... **5**

**Chapitre I : Synthèse bibliographique de *Tetraclinis articulata* (Thuya)** ..... **6**

I.1. Présentation de la plante ..... **6**

I.2. Description botanique ..... **8**

I.3. Systématique de *Tetraclinis articulata* ..... **9**

I.4.Usages thérapeutiques ..... **9**

I.5. Les métabolites secondaires de *Tetraclinis articulata* ..... **10**

I.5.1. Les huiles essentielles ..... **10**

I.5.1.1. La composition chimique des huiles essentielles ..... **10**

I.5.1.2. Les activités biologiques des huiles essentielles ..... **16**

I.5.2. Les extraits ..... **20**

I.5.3. Autres études sur *Tetraclinis articulata* ..... **22**

**Chapitre II : Les différentes techniques d'extraction et d'analyse des constituants d'un mélange naturel** ..... **23**

I. Techniques d'extraction des constituants d'un mélange naturel ..... **23**

I.1. Les méthodes conventionnelles ..... **23**

I.1.1. Hydrodistillation ..... **23**

I.1. 2. Entraînement à la vapeur d'eau ..... **23**

I.1 3. Extraction au moyen de solvants ..... **24**

I.1.4. Le pressage à froid ..... **24**

I.2. Les méthodes innovantes ..... **24**

I.2.1. Extraction assistée par les ultrasons ..... **25**

I.2.2. Extraction assistée par les micro-ondes ..... **25**

I.2.3. Extraction par $CO_2$ supercritique ..... **26**

II. Identification des constituants dans un mélange complexe ..... **27**

II.1. Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A ..... **28**

II.1.1. CPG et les indices de rétention ..... **28**

II.1.2. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique ..... **29**

II.1.2.1. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN) ..... **29**

II.1.2.2. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM ..... **30**

II.1.2.3. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM ..... **31**

II.1.2.4. Le couplage CLHP-CPG-SM ..... **31**

II.1.2.5. Le couplage CLHP-RMN $^{1}$H ..... **32**

II.1.2.6. Le couplage CLHP-RMN $^{1}$H-SM ..... **32**

II.2. Identification des constituants après purification : Voie B ..... **32**

II.3. Analyse par RMN du $^{13}$C sans séparation préalable : Voie C ..... **34**

II.3.1. Intérêt de la RMN du $^{13}$C ..... **34**

II.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du $^{13}$C ..... **35**

II.3.2.1. Observation des signaux ..... **35**

II.3.2.2. Individualisation des signaux ..... **35**

II.3.2.3. Attribution des signaux ..... **36**

II.3.3. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse ..... **37**

II.3.3.1. Principe de la méthode ..... **37**

II.3.3.2. Les domaines d'application de la RMN $^{13}$C ..... **39**

-a- Les huiles essentielles ..... **39**

-b- Les extraits végétaux et les résines (composés lourds, acides ou polaires)..... **40**

-c- Les huiles végétales ..... **40**

-d- L'identification de stéréo-isomères ..... **41**

-e- Mise en évidence de la variabilité chimique ..... **41**

-f- Analyse structurale de nouvelles molécules ..... **42**

**Chapitre III : Les activités biologiques des huiles essentielles** ..... **44**

I. Propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles ..... **44**

I.1.Les antibiotiques ..... **44**
I.1.1. Les cibles bactériennes des antibiotiques ..... **44**
I.1.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques ..... **45**
I.1. 3. Les mécanismes de résistance ..... **46**
I.2. Les huiles essentielles ..... **47**
I.2.1. Les constituants des huiles essentielles ..... **47**
I.2.1.1. Les terpènes et les terpénoïdes ..... **48**
I.2.1.2. Les composés possédant un noyau aromatique ..... **48**
I.2.1.3. Les composés d'origine diverses ..... **49**
I.2.1.4. Chémotype ..... **49**
I.2.2. Mécanisme de l'action antimicrobienne des huiles essentielles ..... **50**
I.2.2.1. Mode d'action antibactérien ..... **50**
-a- Sites d'action des huiles essentielles ..... **50**
-b- Sites d'action de quelques composés des huiles essentielles ..... **51**
I.2.2.2. Mode d'action antifongique ..... **52**
I.2.3. Synergie et antagonisme entre les constituants des huiles essentielles ..... **52**
I.2.4. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ..... **53**
II. Propriétés antioxydantes des huiles essentielles ..... **55**
II.1. Les antioxydants et le stress oxydatif ..... **55**
II.2. Les activités antioxydantes des huiles essentielles ..... **57**
III. Propriétés anti-inflammatoires des huiles essentielles ..... **57**
**2ème partie : Partie expérimentale ..... 58**
I. Matériel végétal et extraction des huiles essentielles ..... **59**
I.1. Matériel végétal ..... **59**
I.2. Extraction des huiles essentielles ..... **60**
II. Analyse des huiles essentielles ..... **62**
II.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) ..... **62**
II.2. Spectrométrie de Masse (SM) ..... **62**
II.3. Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 (RMN $^{13}C$)..... **63**
II.4. Analyse statistique ..... **64**
III. Etude des activités biologiques des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* ..... **64**

III.1. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes de *Tetraclinis articulata* ..... **65**

III.1.1. Provenance des germes ..... **65**

III.1.2. Mise en culture des souches ..... **65**

III.1.3. Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles ..... **66**

III.1.3.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) ..... **66**

III.1.3.2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé ..... **67**

III.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes et des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **67**

III.2.1. Méthode d'étude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles ..... **68**

III.2.1.1. Piégeage du radical libre DPPH· (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) ..... **68**

III.2.1.2. Activité antioxydante par le test de blanchissement du *β*-carotène *(β-carotene bleaching method)* ..... **69**

III.2.1.3. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) …..... **70**

**3ème partie : Résultats et discussion** ..... **71**

I. Caractérisation chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* ..... **73**

I.1. Etude de la composition et de la variabilité chimique des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **73**

I.1.1. Rendements d'extraction ..... **74**

I.1.2. Etude de la composition et de la variabilité chimique de l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **77**

I.1.2.1. Analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **77**

I.1.2.2.Variabilité chimique de l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **81**

I.1.3. Etude de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles d'un pied de *Tetraclinis articulata* au cours d'une année ..... **88**

I.1.3.1. Rendement d'extraction ..... **88**

I.1.3.2. Composition chimique de l'huile essentielle des échantillons d'un même pied au cours d'une année ..... **88**

I.2. Etude de la composition et de la variabilité chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **91**

I.2.1. Rendements d'extraction ..... **91**

I.2.2. Etude de la composition et de la variabilité chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **92**

I.2.2.1. Analyse détaillée de six échantillons d'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **93**

I.2.2.2. Variabilité chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **95**

II. Etude des activités biologiques des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* ..... **100**

II.1. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **100**

II.1.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) ..... **100**

II.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé ..... **103**

II.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **108**

II.2.1. Piégeage du radical libre DPPH· (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) ..... **109**

II.2.2. Activité antioxydante par le test de blanchissement du *β*-carotène ..... **113**

II.2.3. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) ..... **113**

**Conclusion** ..... **118**

**Références bibliographiques** ..... **126**

**Annexes** ..... **157**

**Publications** ..... **173**

# Table des illustrations

## Liste des photos

**Photo 1 :** Fleur femelle et cône mâle de *Tetraclinis articulata* ..... …**7**
**Photo 2 :** Cône femelle après fécondation de *Tetraclinis articulata* ..... …**7**
**Photo 3 :** Cône femelle à maturité de *Tetraclinis articulata* ..... **7**
**Photo 4 :** Arbre entier de *Tetraclinis articulata* ..... **7**
**Photo 5 :** Inhibition de *Staphylococcus aureus* par le camphre ..... …**101**
**Photo 6 :** Inhibition de *Staphylococcus aureus* par l'α-pinène ..... …**101**
**Photo 7 :** Inhibition de *Staphylococcus aureus* par l'acétate de bornyle ..... **101**
**Photo 8 :** Résistance de *S. aureus* au camphre à la concentration de 2 µL/mL ..... **107**
**Photo 9 :** Inhibition totale de *S. aureus* par le camphre à la concentration de 3 µL/mL .. …**107**
**Photo 10 :** Inhibition totale de *S. aureus* par l'α-pinène à la concentration de 6 µL/mL . …**107**

## Liste des figures

**Figure 1 :** Évolution en composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* au cours du séchage à l'ombre ..... **14**
**Figure 2 :** Description schématique de système d'extraction par l'entraînement à la vapeur **24**
**Figure 3 :** Extraction par micro-onde sans solvant ..... **26**
**Figure 4 :** Schéma descriptif du dispositif d'extraction par $CO_2$ supercritique ..... **27**
**Figure 5 :** Méthodes d'analyse d'un mélange complexe ..... **28**
**Figure 6 :** Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du $^{13}C$ ..... **38**
**Figure 7 :** Mode d'action des antibiotiques ..... **45**
**Figure 8 :** Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries ..... **46**
**Figure 9 :** L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance ..... …**47**
**Figure 10 :** Structure de la molécule d'isoprène ..... **48**
**Figure 11 :** Structure de quelques composés des huiles essentielles ..... **48**
**Figure 12 :** Exemple de quelques composés aromatiques C6-C3 caractéristiques des HEs .. **49**
**Figure 13 :** Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne ..... ..**51**
**Figure 14 :** Situation géographique des lieux des prélèvements de *Tetraclinis articulata* .... **61**
**Figure 15 :** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH ..... **69**
**Figure 16 :** Analyse en composantes principales de 50 échantillons des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **85**

**Figure17 :** Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse de Cluster de 50 échantillons des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **87**

**Figure 18 :** Analyse en composantes principales (PCA) de 40 échantillons d'huile essentielle des cônes *de Tetraclinis articulata* ..... **97**

**Figure 19 :** Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse de Cluster de 40 échantillons d'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **97**

**Figure 20 :** Pouvoir réducteur des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* testés par la méthode de FRAP ..... **114**

**Figure 21 :** Pouvoir réducteur des huiles essentielles des cônes (échantillons du groupe I) de *Tetraclinis articulata* testés par la méthode de FRAP ..... **115**

**Figure 22 :** Pouvoir réducteur des huiles essentielles des cônes (échantillons du sous-groupe IIA) de *Tetraclinis articulata* testé par la méthode FRAP..... **115**

**Figure 23 :** Pouvoir réducteur des huiles essentielles des cônes (échantillons du sous-groupe IIB) de *Tetraclinis articulata* testés par la méthode FRAP ..... **116**

## Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Lieux des prélèvements du thuya, situation géographique et bioclimat des différentes stations d'étude ..... **60**

**Tableau 2 :** Origine des souches utilisées pour l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles ..... **65**

**Tableau 3 :** Rendements (en %) en huiles essentielles de 50 échantillons des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* des différentes stations ..... **76**

**Tableau 4 :** Composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **79**

**Tableau 5 :** Composés majoritaires identifiés dans les 50 échantillons d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **82**

**Tableau 6 :** Composés majoritaires dans l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* des différentes régions selon la littérature ..... **83**

**Tableau 7 :** Composés majoritaires identifiés dans les 50 échantillons des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* ..... **87**

**Tableau 8 :** Rendements (en %) en huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* au cours d'une année (AK37) ..... **88**

**Tableau 9 :** Composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles récoltées à partir d'un même pied de *Tetraclinis articulata* au cours d'une année ..... **90**

**Tableau 10 :** Rendements (en %) en huiles essentielles de 40 échantillons de cônes de *Tetraclinis articulata* des différentes stations ..... **92**

**Tableau 11 :** Composition chimique des six échantillons d'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* ..... **94**

**Tableau 12 :** Variabilité chimique d'huile essentielle des cônes : les principaux composants dans les 40 échantillons ..... **96**

**Tableau 13 :** Composés majoritaires dans l'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* des différentes régions selon la littérature ..... **99**

**Tableau 14 :** Composés majoritaires dans les huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* utilisés pour les activités biologiques ..... **100**

**Tableau 15 :** Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de trois huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* relatives aux souches microbiennes selon la méthode de disque..... **102**

**Tableau 16 :** Concentrations minimales inhibitrices (CMIs) en huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* relatives aux souches sensibles ..... **103**

**Tableau 17 :** Composés majoritaires dans les échantillons des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata* utilisés pour l'étude de l'activité antioxydante ..... **108**

**Tableau 18 :** Activité antioxydante des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata* vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH exprimée en pourcentage d'inhibition..... **109**

**Tableau 19 :** Pouvoir réducteur des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata* exprimé en $CE_{50}$..... **113**

## Liste des abréviations

**ADN : A**cide **D**ésoxyribonucléique
**ARN: A**cide **R**ibonucléique
**BHT: B**u**t**yl-**H**ydroxy-**T**oluène
**CC : C**hromatographie sur **C**olonne
**CCM : C**hromatographie sur **C**ouche **M**ince
**$CI_{50}$ : C**oncentration **I**nhibitrice de **50%** de DPPH
**CLHP : C**hromatographie **L**iquide **H**aute **P**erformance
**CLHP-CPG-SM : C**hromatographie **L**iquide **H**aute **P**erformance couplée à la **C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse et à la **S**pectrométrie de **M**asse
**CLHP-SM : C**hromatographie **L**iquide **H**aute **P**erformance couplée à la **S**pectrométrie de **M**asse
**CMI : C**oncentration **M**inimale **I**nhibitrice
**COSY : CO**rrelation **S**pectroscop**Y** (corrélation $^{1}H$-$^{1}H$ simple liaison)
**CPG : C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse
**CPG(Ir) : C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse (associée aux **I**ndices de **r**étention)
**CPG-IRTF : C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse couplée à la **S**pectroscopie **I**nfra-**R**ouge à **T**ransformée de **F**ourrier
**CPG-IRTF-SM : C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse **couplée** à la **S**pectroscopie **I**nfra-**R**ouge à **T**ransformée de **F**ourrier et **S**pectrométrie de **M**asse
**CPGMD : C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse **M**ulti-**D**imensionnelle
**CPG-SM : C**hromatographie en **P**hase **G**azeuse couplée à la **S**pectrométrie de **M**asse
**DEPT: D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer
**DMSO : D**i**m**éthyl**s**ulf**o**xyde
**DPPH :** 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl
**$CE_{50}$ : C**oncentration **E**ffective, à laquelle l'absorbance est égale à 0,5
**FID : D**étecteur à **I**onisation de **F**lamme
**FRAP : F**erric **R**educing **A**ntioxidant **P**ower
**HD: H**ydrodistillation **C**onventionnelle
**HE : H**uile **E**ssentielle
**HMBC : H**eteronuclear **M**ultiple **B**onds **C**orrelation (corrélation $^{1}H$-$^{13}C$ longue distance, deux ou trois liaisons)
**HSQC : H**eteronuclear **S**imple **Q**uantum **C**orrelation (corrélation $^{1}H$-$^{13}C$ simple liaisons)
**IRTF : S**pectroscopie **I**nfra-**R**ouge à **T**ransformée de **F**ourrier
**MAHD : H**ydrodistillation **A**ssistée par **M**icro-ondes
**NDGA : A**cide **N**ordihydroguaiarétique
**ppm : P**artie **p**ar **m**illion
**RMN $^{1}H$/ $^{13}C$ : R**ésonnance **M**agnétique **N**ucléaire du **P**roton / du **C**arbone
**RMN (1D et 2D) : R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire (mono- et bidimensionnelle)
**SFE : E**xtraction par **F**luide **S**upercritique
**SM(ICN) : S**pectrométrie de **M**asse (mode **I**onisation **C**himique **N**égative)
**SM(ICP) : S**pectrométrie de **M**asse (mode **I**onisation **C**himique **P**ositive)
**SM(IE) : S**pectrométrie de **M**asse (mode **I**mpact **E**lectronique)
**UFC : U**nité **F**ormant **C**olonie
**ºC : D**egré **C**elsius
**h : H**eure
**IK** : **I**ndice de **K**ováts
**Ir** : **I**ndice de **r**étention
**IE : I**mpact **E**lectronique

**g : G**ramme
**Km : k**ilomètre
**L : L**itre
**m : M**ètre
**mL : M**illilitre
**µL: M**icrolitre
**µg: M**icrogramme
**% :** Pourcentage
**δ:** Déplacement chimique
**δ $^{1}$H :** Déplacement chimique RMN $^{1}$H
**δ $^{13}$C :** Déplacement chimique RMN $^{13}$C
**Δδ:** Variation de déplacement chimique

# Introduction

Les vertus thérapeutiques des plantes aromatiques et médicinales ont été expérimentées depuis plusieurs siècles et leurs précieuses vertus, se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicinales naturelles. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine. En effet, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antimicrobienne et antioxydante, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou peu connues dans la médecine et les traditions médicinales populaires. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font toujours l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment pour la recherche de nouveaux constituants naturels présents en particulier dans les huiles essentielles. Ces dernières ont permis, par leur facilité d'obtention, leur très grande diversité chimique et leur valeur ajoutée, de grands développements dans la préparation de nombreux produits dans les domaines pharmaceutiques, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire.

L'utilisation des vertus antimicrobiennes des huiles essentielles est déjà ancienne. Cette importance donnée à l'étude des maladies microbiennes fait suite à l'apparition de la résistance des souches aux médicaments les plus communément utilisées **(Balkis *et al.*, 2002 ; Ju *et al.*, 2002)**. Le principal déterminant de l'apparition de cette résistance est sans aucun doute, la pression de sélection des antibiotiques et des antifongiques à laquelle les populations microbiennes sont soumises **(Soussy, 1997)**.

A coté des infections microbiennes, les radicaux libres sont impliqués dans un grand nombre de pathologies qui sont maintenant considérées comme l'un des problèmes majeurs de santé publique. Les scientifiques dans diverses disciplines sont plus enclins à utiliser les sources naturelles qui pourraient fournir les composants actifs employés pour empêcher ou réduire l'impact de ces radicaux libres sur les cellules **(Yan *et al.*, 2002)**. L'activité anti-radicalaire des plantes a été démontrée *in vitro* avec des perspectives d'établissement de nouvelles drogues anti-radicalaires. On assiste, ces dernières années, à un regain d'intérêt pour les plantes médicinales et aromatiques et pour leurs extraits **(Sabu et Kattan, 2002)**.

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec un large spectre de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. Plus de 5 000 de substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entres elles se sont avérées utile dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies. Malgré l'extrême diversité de ces ressources végétales sur le continent, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents chimio-thérapeutiques et prophylactiques de ces plantes **(Farombi, 2003)**.

Dans un pays comme l'Algérie riche d'une flore très diversifiée, la valorisation de la filière des plantes aromatiques et médicinales est devenue indispensable. C'est pourquoi, nous avons mené durant cette thèse, en collaboration avec l'équipe « Chimie & Biomasse » de l'université de Corse, des études pour valoriser *Tetraclinis articulata* (Thuya), espèce végétale aromatique poussant spontanément dans la région de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie), en procédant à la caractérisation chimique et à l'étude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes.

Après cette introduction, nous avons structuré ce mémoire en trois grandes parties.

- La première partie est une synthèse bibliographique, et comporte trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à la présentation botanique de *Tetraclinis articulata*, les propriétés thérapeutiques et les travaux déjà réalisés sur cette plante. Le deuxième chapitre concerne les différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles et les principales techniques d'analyse de ces dernières, avec leurs avantages et leurs limites. Nous présenterons également la méthode d'analyse par RMN du carbone 13 développée par l'équipe « Chimie & Biomasse » de l'université de Corse. Enfin, dans le troisième chapitre, nous avons présenté le pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et nous avons mis en évidence, les agents antibactériens classiques, leur mécanisme d'action et le phénomène de résistance. Ensuite, nous avons rapporté l'intérêt que suscitent les huiles essentielles autant qu'agents antimicrobien et antioxydant en citant leurs applications dans divers secteurs.
- La deuxième partie est expérimentale, s'articule selon trois axes distincts :

Nous détaillons, dans un premier temps l'échantillonnage des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de la plante récoltée dans huit stations de la région de Tlemcen, l'obtention des huiles essentielles par extraction, ainsi que leur caractérisation en combinant plusieurs méthodes d'analyse chromatographiques et spectroscopiques (Chromatographie en Phase Gazeuse, Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse et la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 pour l'analyse des mélanges). Nous abordons ensuite, l'étude de pouvoir antimicrobien des huiles

essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*, en utilisant deux méthodes :

- ✓ Méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme) ;
- ✓ Détermination des concentrations minimales d'inhibition (CMIs) par la méthode de contact direct en milieu gélosé.

Nous achevons cette partie par l'étude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes et des cônes de cette plante, en appliquant trois méthodes :

- ✓ Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) ;
- ✓ Activité antioxydante par le test de blanchissement du *β*-carotène ;
- ✓ Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*).

➢ La troisième et dernière partie du mémoire propose une synthèse et une discussion des résultats obtenus, concernant à la fois la caractérisation chimique des huiles essentielles et leurs activités biologiques tandis qu'une conclusion détaillée achève la présentation écrite.

# Première partie

## Synthèse bibliographique

***« C'est ce que nous pensons déjà connaître qui nous empêche souvent d'apprendre »***

**Claude Bernard** (1813-1878)

# Chapitre I : Synthèse bibliographique de *Tetraclinis articulata* (Thuya)

## I.1. Présentation de la plante

Le thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters), est une Cupressacées quasiment endémique de l'Afrique du Nord. Cette espèce végétale est essentiellement centrée sur le Maghreb, puisqu'en dehors de cette région, il ne se rencontre à l'état résiduel que sur le littoral du sud-est de l'Espagne dans la région de Carthagène, et à Malte, où il est en voie d'extinction **(Quézel et Médail, 2003)**. En Afrique du Nord, où ses peuplements atteignent un million d'hectares environ, il est surtout présent au Maroc (900 000 ha), essentiellement sur le plateau central, depuis le nord du Rif au l'Anti-Atlas et dans la région d'Ifni. En revanche, il fait défaut au Maroc sud-oriental steppique**.** En Tunisie, il est bien présent entre Bizerte et Zaghouan **(Quézel et Médail, 2003).** En Algérie, il ne représente actuellement que moins de 140 000 ha **(Letrech Belarouci, 1991, Maatoug *et al.*, 2004)** alors qu'il couvrait plus de 160 000 ha autrefois **(BOUDY, 1950)**. Il offre quelques stations isolées dans l'Algérois, notamment en situation littorale à l'ouest d'Alger, par contre, il est assez largement présent en Oranie littorale **(Quézel et Médail, 2003)**.

Longtemps considérée comme une essence forestière sans grand intérêt, les écologues et les forestiers insistent actuellement sur la place éminente qu'il joue dans la structuration des paysages végétaux du Maghreb, mais aussi sur sa valeur forestière et économique **(Quézel et Médail, 2003)**.

Il pousse à des hauteurs qui oscillent du niveau de la mer jusqu'à 1 800 m d'altitude dans un climat méditerranéen en zone semi-aride. Les essences propres à l'ébénisterie que l'on rencontre dans les forêts de l'Algérie sont nombreuses et variées. Mais aucune ne saurait rivaliser avec le thuya de Barbarie tant sous le rapport de la beauté que de la solidité **(De Rosny, 1856)**. En effet, son bois, connu sous le nom de **citre**, est très solide, caractérisé par sa résistance à la pourriture. On l'utilise surtout dans le secteur artisanal pour la marqueterie, l'ébénisterie, pour la charpente de maisons traditionnelles et aussi comme bois de feu **(UICN et AGIR, 2011 ; Alami, 2013)**. Son écorce est riche en extrait de résine de grande valeur utilisée dans la fabrication des vernis **(Maatoug *et al.*, 2004)**. Les racines, surtout des vieux arbres, constituent un bois précieux et parfumé très utilisé en ébénisterie, notamment à Essaouira **(UICN et AGIR, 2011)**. Par sa rusticité, sa résistance aux agents de destruction et la qualité extrêmement importante de son bois, il occupe la seconde place après le pin d'Alep et le chêne vert. Cette essence est très résistante aux maladies et aux attaques entomologiques et cryptogamiques **(Maatoug *et al.*, 2004)**.

**Photo 1 :** Fleur femelle et cône mâle de *Tetraclinis articulata*
(Station d'Aïn Kebira, le 01/04/2016)

**Photo 2 :** Cône femelle après fécondation de *Tetraclinis articulata*
(Station d'Aïn Kebira, le 01/04/2016)

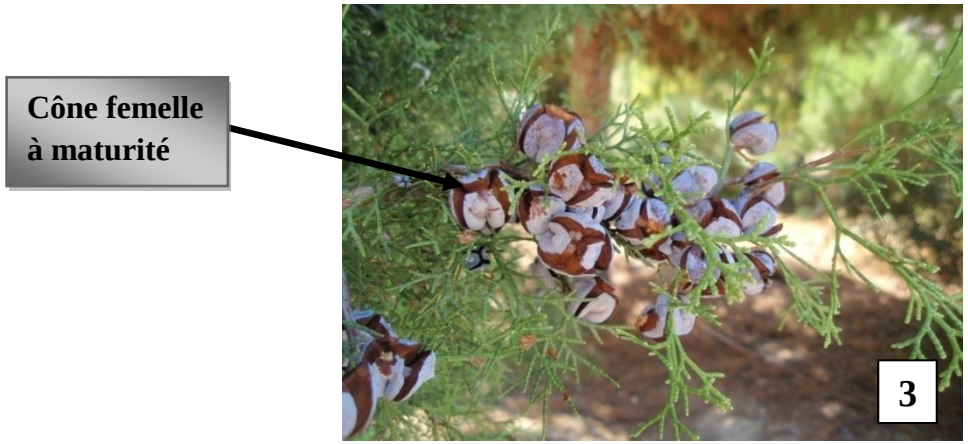



**Photo 3 :** Cônes femelle à maturité de *Tetraclinis articulata*

(http://herbariovirtualbanyeres.blogspot.com/2011_10_16_archive.html)

**Photo 4 :** Arbre entier de *Tetraclinis articulata*

( http://www.laopiniondemurcia.es/cartagena/2014/08/07/ue protege-bosques-cipres-cartagena/579985.html)

**Noms vernaculaires :**

- ***En Français :***

- Thuya de Barbarie **(De Rosny, 1856 ; Quézel et Santa, 1962 ; Buhagiar *et al.*, 2000)** ; thuya de Berbérie **(Fennane, 1989 ; Haddad *et al.*, 2006 ; Lahsissene *et al.*, 2009 ; UICN et AGIR, 2011, Bourkhiss *et al.*, 2012)** ; thuya de Maghreb **(Maatoug *et al.*, 2004)**.

- ***En Arabe :***

- Ahrar ou Berbouch **(Quézel et Santa, 1962 ; Buhagiar *et al.*, 2000)** ; shagaret el-hayat, megloub **(Buhagiar *et al.*, 2000)** ; Arar **(Buhagiar *et al.*, 2000 ; Salhi *et al.*, 2010)** ; Al'Aarâar **(El Bouhtoury-Charrier *et al.*, 2009)** ; Ar'âr **(Lahsissene *et al.*, 2009)** ; El'ar'ar **(Benkhnigue *et al.*, 2011)** ; Araâr **(Azzi *et al.*, 2012)**.

Au Maroc, *T. articulata* est connue sous les noms suivants : l'erar **(Ait Igri *et al.*, 1990)**, l'abhel ou azuka **(Ait Igri *et al.*, 1990 ; Buhagiar *et al.*, 2000)**.

- ***En anglais :***

- Cartagena cypress **(Buhagiar *et al.*, 2000)** ; Barbary Thuya **(El Bouhtoury-Charrier *et al.*, 2009)** ; Sandarac tree **(El Bouhtoury-Charrier *et al.*, 2009 ; Ben Jemia *et al.*, 2012)**.

**Noms scientifiques :**

- *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters ; *Callitris quadrivalvis* Vent. ; *C. articulata* (Vahl) Link **(Quézel et Santa, 1962)** ; *Thuja articulata* (Vahl) **(Buhagiar *et al.*, 2000 ; El Bouhtoury-Charrier *et al.*, 2009)**.

**I.2. Description botanique**

Le genre monotypique *Tetraclinis* est un arbre ou arbuste, souvent petit et buissonnant, rejetant de souche. Les rameaux sont aplatis, verts et articulés **(Quézel et Santa, 1962)**.

Le thuya est un résineux à feuillage léger et persistant. Dans sa jeunesse, son port est pyramidal, les feuilles sont réduites en écailles opposées et imbriquées par deux, les fleurs en chaton, situées à l'extrémité des rameaux **(Boudy, 1952)**. Les fruits sont des cônes glauques et pruineux, dont les 4 valves sont munies au sommet d'un appendice plat et réfléchi **(Quézel et Santa, 1962)**. Les cônes sont d'allure cubique s'ouvrant par les 4 valves sous l'effet de la chaleur, libérant ainsi six graines ailées. La fructification démarre vers l'âge de 15 ans et se répète tous les deux à trois ans jusqu'à un âge très avancé **(Boudy, 1952)**. En effet, Il est caractérisé essentiellement par sa longévité qui dépasse 400 ans **(Maatoug *et al.*, 2004)**. L'ouverture des cônes, n'a lieu qu'à la fin de l'été. La production de graines de cette essence est relativement bonne voire très bonne (100 000 graines/kg) et le problème de sa régénération naturelle ne semble pas être freinée par la quantité de semences produites (**Hadjadj Aoual, 2009)**.

*Tetraclinis articulata* est une espèce monoïque qui dépasse rarement 6 à 8 m de haut et 0,30 m de diamètre en moyenne. Il existe néanmoins quelques peuplements difficiles d'accès où les dimensions peuvent être plus importantes (12 m pour 0,50 m). Quelques vieux sujets allant jusqu'à 20 m de haut pour 1 m de diamètre, ont été observé, mais cela reste exceptionnelle (arbre marabout) **(Hadjadj Aoual, 2009)**. La longévité des semences est d'après **Emberger**, **(1938) et Greco (1966)** de 6 à 8 mois. Cependant, les graines stockées à l'obscurité et en ambiance sèche gardent une bonne capacité germinative allant jusqu'à 20 mois environ. La dissémination de ces graines reste assez limitée et le plus gros des semences se retrouvent au pied même de l'arbre contrairement au pin d'Alep beaucoup plus expansionniste (**Acherar, 1981)**.

**I.3. Systématique de *Tetraclinis articulata***

D'après **Quézel et Santa (1962)**, le thuya fait partie de :

- Embranchement : Spermaphytes
- Sous- Embranchement : Gymnospermes
- Classe : Conifères
- Ordre : Coniférales
- Famille : Cupressacées
- Genre : *Tetraclinis*
- Espèce : *Tetraclinis articulata*

**I.4. Usages thérapeutiques**

Différentes parties de thuya sont employées en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. En effet, il est principalement utilisé contre les infections respiratoires et intestinales, les douleurs gastriques, le diabète, l'hypertension. Il est conseillé également comme anti-diarrhéique, fébrifuge, diurétique, antirhumatismal et hypoglycémiant oral **(Bellakhdar *et al.*, 1982 ; Ait Igri, 1990 ; Bellakhdar *et al.*, 1991 ; Ziyyat *et al.*, 1997 ; Farjon, 1998)**.

Par ailleurs, une décoction de poudre des rameaux mélangée à la poudre de l'écorce de Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) est utilisée en bain contre la fièvre infantile. Le cataplasme de feuilles est utilisé en cas de migraines. Une décoction de feuilles est indiquée dans le traitement des douleurs gastro-intestinales **(Salhi *et al.*, 2010)** ainsi que pour guérir des contusions et des blessures **(Djouahri et Boudarene, 2012)**. Les feuilles en poudre associées au henné (*Lawsonia inermis* L.) sont appliquées en cataplasme, sur le cuir chevelu comme adoucissant et comme traitement antichute **(Lahsissene *et al.*, 2009 ; Salhi *et al.*,**

**2010)**. En usage externe, les feuilles sont utilisées sur les blessures et sur la plaie ombilicale du nouveau né, comme cicatrisant **(Bellakhdar, 1997)**.

Le thuya de Berbérie est réputé dans la médecine traditionnelle marocaine, il est employé comme émétique, anti-diarrhéique. Il est conseillé également contre le vertige et la fièvre, et pour traiter l'inflammation des yeux **(Bellakhdar, 1997)**. En Tunisie et dans d'autres pays d'Afrique du nord, il est utilisé en médecine traditionnelle humaine et vétérinaire, en particulier contre les maux intestinaux et respiratoires et contre les infections cutanées **(Le Floc'h 1983 ; Buhagiar *et al.*, 2000)**. Dans la région de Zaër (Maroc Occidental), une macération des feuilles, dans du lait, est administrée comme émétique dans divers épisodes d'intoxication et comme hypoglycémiant **(Lahsissene *et al.*, 2009)**.

Dans la région de Tlemcen (Algérie), une macération des feuilles de thuya est utilisée contre le diabète **(Azzi *et al.*, 2012)**

Au sud du Maroc, les populations locales gemmaient le thuya pour en tirer la gomme sandaraque qui est employée en pharmacie et pour les vernis de luxe **(Bellakhdar, 1997)**.

Enfin, il est à noter que le thuya est un abortif dangereux à fortes doses **(Hmamouchi, 1999)**.

## I.5. Les métabolites secondaires de *Tetraclinis articulata*

### I.5.1. Les huiles essentielles

#### I.5.1.1. La composition chimique des huiles essentielles

Plusieurs travaux ont été effectués sur la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*. En général, elles concernent la composition de l'huile essentielle d'un seul ou bien de diverses parties du végétal (feuilles, rameaux, cônes, branches, graines, racines et bois ou sciure du bois).

- **L'huile essentielle du bois**

À notre connaissance, huit publications font état de la composition chimique des huiles essentielles du bois et de la sciure du bois de *T. articulata* :

- Le composé majoritaire de l'huile essentielle du bois de thuya de l'Oued Cherrat (Maroc) est le carvacrol (28,0%), suivi de *p*-méthoxythymol (22,1%), le thymohydroquinone (16,1%), le cédrol (7,2%), le terpinén-4-1-ol (5,4%) et l'α-pinène (3,8%) **(Ait Igri *et al.*, 1990**).

- **Zrira *et al.* (2005)** ont déterminé la composition chimique de 2 échantillons de la sciure du bois récoltés dans les régions de khemisset (80 km nord de Rabat, Maroc) et d'Aoulouz (600 km sud de Rabat, Maroc). Le carvacrol (21,3%, 36,4%), l'α-cédrène (10,1%, 13,1%), le

cédrol (1,0%, 7,3%) et le terpinèn-4-ol (2,8%, 6,0%) sont les principaux composants, respectivement.

- L'huile essentielle originaire du Maroc contient le 2,5-diméthoxyacétophénone (22,5%), le β-acorénol (20,4%) et le cédrol (12,2%) comme composés majoritaires **(Satrani *et al.*, 2004)**.
- Par contre, l'étude menée par **Barrero *et al.*** en **2005** montre que la composition chimique de l'huile essentielle provenant de la région d'Amsa, (près de Tétouan, Maroc) contient le cédrol (28,2%) et le 1,7-di-épi-cédrol (17,9%) comme composés majoritaires.
- L'analyse par CPG et CPG-SM de l'huile essentielle de la sciure du bois prélevée dans la région de Khemisset (Maroc) a permis d'identifier 22 constituants dont les cinq majoritaires sont : l'α-acorénol (20,9%), le cédrol (17,9%), le totarol (8,8%), l'α-cédrène (8,7%) et le β-acorénol (7,4%) **(Bourkhiss *et al.*, 2009a)**.
- **El Moussaouiti *et al.* (2010)** ont réalisé une étude sur la composition chimique de l'huile essentielle extraite du bois récolté dans la région d'Oulmes (Maroc). Le composé majoritaire est le cédrène (22,7%), suivi du thymol (21,6%), du 3-*t*-butyl-4-méthoxyphénol (19,0%), du cédrénol (9,6%), du muurolène (5,4%), et de sclarène (3,0%).
- L'étude menée par **Farah *et al.*** en **2010** sur l'huile essentielle de la sciure du bois traité et non traité provenant de la région d'Essaouira (Maroc) a montré que la composition chimique est caractérisée par la prédominance également du carvacrol (41,2% contre 30,5% pour le bois non traité), suivi du O-méthylthymodroquinone (10,8% contre 16,5% pour le bois non traité) et du cédrol (2,5% contre 12,1% pour le bois non traité).
- Très récemment, **Djouahri *et al.* (2015)** ont étudié également la composition chimique des huiles essentielles du bois récolté dans quatre régions (Zeddine, Aïn Defla ; Mansoura, Bordj-Bou-Arreridj ; Zekkar, Djelfa et Tazoult, Batna). Les composés majoritaires, sont le camphène(15,5-18,8%), cédrol (10,5-12,7%) et α-acorénol (8,2-10,4%), suivi par le *(Z)*-β-ocimène (5,1-5,5%), le β-cédrène (4,0-5,1%), l'α-acoradiène (5,3-6,1%) et *trans*-totarol (5,5-6,5%).

- **L'huile essentielle des racines**

- Une seule étude concerne l'huile essentielle des racines de *T. articulata* prélevées dans la région de Zaghouan **(Tékaya-Karoui *et al.*, 2007)**. Ce travail réalisé en Tunisie fait état d'une composition très riche en camphène (70,2%). Elle renferme aussi une quantité appréciable en acétate de bornyle (16,6%), suivi par le γ-cadinène (2,9%) et le camphène (1,6%).

- **L'huile essentielle des cônes**

À notre connaissance, seulement trois études concernent l'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* **(Buhagiar *et al.*, 2000 ; Tékaya-Karoui *et al.*, 2007 ; Chikhoune *et al.*, 2013).** Ces études, réalisées en Malte et en Algérie, rapportent une composition chimique dominée par l'α-pinène (68,2% en Malte, 57,5-75,0% en Algérie), suivi par le limonène (16,6% et 10,6-20,9%). Nous notons également la présence de β-myrcène (3,6-10,6%) dans l'huile essentielle d'Algérie **(Chikhoune *et al.*, 2013)**. Par contre, **Tékaya-Karoui *et al.*** en **2007,** rapportent une composition très différente. Cet échantillon originaire de Tunisie renferment plusieurs composés présents en quantités appréciables : *p*-cymèn-8-ol (10,4%), *trans*-pinocarvéol (6,1%), acétate de fenchyle (5,1%) et carvone (5,3%).

- **L'huile essentielle des graines**

Un seul échantillon d'huile essentielle des graines de thuya récoltées à Msida (Malte) contient deux composés majoritaires : l'α-pinène (46,3%), et le limonène (25,3%). D'autres composés sont présents en quantités appréciables, il s'agit de : germacrène D (5,0%), acétate de bornyle (2,2%), sabinène (1,7%), myrcène (1,5%), camphre et β-caryophyllène (1,1%) **(Buhagiar *et al.*, 2000)**.

- **L'huile essentielle des branches**

- Au Maroc (Essaouira, Oued Cherrat), deux compositions des huiles essentielles des brindilles ont été mises en évidence. La première est dominée par l'α-pinène (37,2%) et le limonène (23,3%) **(Bourkhiss *et al.*, 2007c)**, tandis que le deuxième échantillon est caractérisée par la prédominance de l'acétate de bornyle (30,5%), suivi par le camphre (18,6%) et le bornéol (10,2%) **(Ait Igri *et al.*, 1990)**.

- L'huile essentielle des branches de thuya prélevées également au Maroc (Khemisset) contient l'α-pinène (30,2%) et le limonène (22,3%) comme composés majoritaires. On note également la présence du widdrol (5,4%) et de l'acétate de bornyle (4,8%) **(Bourkhiss *et al.*, 2007a, 2010b)**.

- L'huile essentielle des branches terminales (ligneuses et non ligneuses) de Malte est caractérisée respectivement par l'α-pinène (31,0% ; 46,4%), suivi par l'acétate de bornyle (19,1% ; 19,9%), le camphre (18,1% ; 7,3%) ; et le limonène (3,8% ; 6,2%) **(Buhagiar *et al.*, 2000)**.

- En Tunisie, les principaux composants dans l'huile essentielle des branches terminales (non ligneuses) étaient le muurolène (29,0%) et le 4,6-diméthylloctane-3,5-dione (22,4%) tandis

que le camphène (43,2%), le *(Z)*-β-ocimène (11,7%) étaient les composés majoritaires dans les branches terminales (ligneuses) **(Tékaya-Karoui *et al.*, 2007)**.

- **L'huile essentielle des feuilles**

En ce qui concerne *Tetraclinis articulata*, l'huile essentielle des feuilles est celle qui a généralement fait l'objet du plus grand nombre de travaux, puisque onze articles ont été publiés ainsi que quatre autres études (postérieure à notre publication) sont également rapportée :

- **Au Maroc :**

- Dans région d'Amsa (près de Tétouan), le composé majoritaire est le camphre (19,1%), suivi de l'acétate de bornyle (16,5%) et de bornéol (9,6%) **(Barrero *et al* ., 2005)**.

- L'étude menée par **Bourkhiss *et al.* (2007c)** sur *Tetraclinis articulata* (Vahl) provenant de la région d'Essaouira ont montré que l'huile essentielle des feuilles est caractérisée par la prédominance du camphre (31,6%) et de l'acétate de bornyle (25,4%).

- Dans la région de Khemisset, deux compositions ont été mises en évidence, dont le composé majoritaire est l'acétate de bornyle (30,7% ; 30,6%, respectivement) suivi par l'α-pinène (23,5% ; 16,8%, respectivement) et le limonène (23,31% ; 5,7%, respectivement). Le camphre est également présent à des teneurs appréciables (17,3% et 18,6%, respectivement) **(Bourkhiss *et al.*, 2007b, 2009a, 2010b)**.

- La composition chimique des huiles essentielles des feuilles fraîches et sèches de thuya prélevées au mois de décembre dans la région de Marrakech est dominée respectivement par l'α-pinène (41,0% ; 23,0%) et l'acétate de bornyle (20,6% ; 36,4%) **(Achak *et al.*, 2009)**. En revanche, dans un autre échantillon récolté au mois de janvier dans la même région, les auteurs identifient l'acétate de bornyle (26,8%) et le camphre (22,4%) comme composés majoritaires, suivis par l'α-pinène (7,2%) et le bornéol (6,4%) **(El Jemli *et al.*, 2016)**.

Enfin, une autre étude porte sur l'évolution des composés majoritaires des huiles essentielles extraites des feuilles de thuya de Berbérie de provenance du Maroc, au cours du séchage à l'ombre (**Figure 1**). Les composés majoritaires sont l'acétate de bornyle (30,6%), le camphre (18,6%), l'α-Pinène (16,8%), le limonène (5,7%) et le Bornéol (4,7%). La concentration cumulative de ces cinq principaux constituants est passée de 61,1%, le premier jour, à 65,3% le treizième jour du séchage à l'ombre. Elle atteint son maximum, soit 70,8%, au septième jour du séchage. Ils soulignent également des fluctuations irrégulières durant la période de séchage. À titre d'exemple, l'α-pinène varie de 23,54%, le premier jour, à 28,78% le treizième jour, tandis que l'acétate de bornyle évolue de 30,74% à 22,27% pendant la même

période. Les autres constituants demeurent pratiquement constants durant la période de stockage **(Bourkhiss *et al.*, 2009b)**.

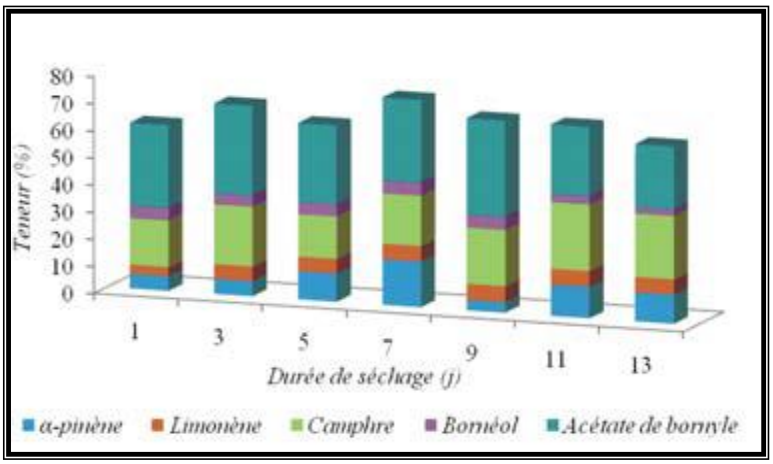



**Figure 1 : Évolution en composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* au cours du séchage à l'ombre**

- **En Tunisie :**

- **Ben Jemia *et al.* (2012)** ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées dans le parc national de Bou Kornine. L'analyse par CPG-SM a permis d'identifier 66 composants dont l'acétate de bornyle (31,4%), l'α-pinène (24,5%) et le camphre (20,3%) sont les constituants majoritaires.

- **Herzi *et al.* (2013)** ont étudié la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* obtenues par deux méthodes d'extraction, l'hydrodistillation et l'extraction par fluide supercritique (SFE) en utilisant différentes pression (90, 280 et 1 000 bar). Les composés majoritaires sont respectivement : l'α-pinène (24,9% ; 31,3% / 0% / 0%) et l'acétate de linalyle (21,4% ; 18,2% / 1,7% / 0%). D'autres composés sont présents en quantités non négligeable, il s'agit respectivement de : l'alloaromadendrène (1,1% ; 7,6% /1,4% / 0%), le γ-caryophyllène (2,5% ; 4,2% / 2,1% / 0%), l'oxyde de caryophyllène (4 ,2% ; 1,8% / 2,5% / 0%) et l'acide palmitique (0% ; 0% / 3,0% / 36,2%).

- Enfin, **Sliti *et al.***, en **2016** ont décrit la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées en Tunisie dans deux stations et sur quatre périodes différentes (Karbous : janvier, avril, mai et novembre ; Jbel abderahman : Mai). Ils montrent une faible variabilité quantitative concernant les composés majoritaires : α-pinène (26,3-36,6%), acétate de bornyle (19,0-25,4%) et camphre (5,5-15,3%). D'autres composés sont présents en quantités appréciables, il s'agit de : limonène (5,3-8,9%), β-myrcène (3,9-6,6%), bornéol (3,0-6,8%) et caryophyllène (0,2-5,1%).

- **En Algérie :**

- **Benali Toumi *et al.* (2011)** ont effectué une étude sur des échantillons des feuilles de *Tetraclinis articulata* prélevées dans trois régions différentes de l'Ouest algérien : EI Haçaiba (Sidi Bel Abbés), Ouled Mimoun (Tlemcen) et Frenda (Tiaret). Les composés majoritaires présentent une variabilité quantitative et sont respectivement, le camphre (26,7% ; 31,6% ; 23,4%), l'acétate de bornyle (25,8% ; 17,1% ; 24,6%), le bornéol (12,9% ; 14,3% ; 6,6%), le limonène (2,7% ; 3,0% ; 10,1%) et l'α-pinène (3,7% ; 6,5% ; 11,3%).

- Dans la région d'Alger, les composés majoritaires sont respectivement l'α-pinène (24,9% ; 19,8%) et l'acétate de bornyle (40,2 ; 59,2%) dans deux échantillons prélevés, respectivement dans deux stations différentes : Hammam Melouane et Tipaza **(Chikhoune *et al.*, 2013)**. On note aussi la présence du camphre, mais à faibles teneurs (2,3% ; 4,8%, respectivement).

- La composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* provenant de la région de Ghazaouet (Tlemcen), est nettement dominée par l'acétate de bornyle (52,1%) suivi de caryophylléne (7,51%), de germacrène D (5,6%) et de l'oxyde de caryophyllène (5,0%). Par contre, le camphre est également présent à une très faible teneur (2,1%) **(Abi-Ayad *et al.*, 2013)**.

- **Djouahri *et al.* (2013a)** ont étudié l'influence de la méthode d'extraction sur la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de thuya récoltées à Aïn Defla (Algérie). Deux techniques d'extraction ont été employées : hydrodistillation conventionnelle (HD) et hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAHD). Cette dernière méthode est plus avantageuse en termes d'économies d'énergie et de temps d'extraction (90 min, 180 min, respectivement). Les huiles essentielles obtenues sont caractérisées par la présence de 26 composés pour HD contre 25 composés pour MAHD représentant respectivement 95,5% et 95,8% dont l'acétate de bornyle ( 24,4% ; 32,4% ), l'α-pinène (23,6% ; 12,5%), le camphre (18,3% ; 21,4%), le limonène (7,0% ; 4,3%), le myrcène (5,5% ; 0,0%) et l'acétate d'α-terpinéol (1,0% ; 6,8%) sont les composés majoritaires, respectivement.

- **Djouahri *et al.* (2015)** ont étudié également la composition chimique des huiles essentielles des feuilles récoltées dans quatre régions (Zeddine, Aïn Defla ; Mansoura, Bordj-Bou-Arreridj ; Zekkar, Djelfa et Tazoult, Batna). Les composés majoritaires, présentent des pourcentages équivalents : α-pinène (16,3-25,3%), le camphre (17,2-21,4%) et l'acétate de bornyle (17,6–20,6%). Le limonène (5,7-7,3%), le β-pinène (4,8-7,2%) et l'α-terpinéol (2,1-4,4%) présentent des teneurs inférieures à 10% alors que le bornéol n'excède jamais 1,5% (0,7-1,5%).

Récemment, dans un échantillon d'huile essentielle des feuilles fraîches récoltées à Messer (Sidi Bel Abbès), les auteurs identifient le camphre (19,6%) et l'acétate de bornyle (18,7%) comme composés majoritaires. Le germacrène D (7,6%), le *trans*-caryophyllène (7,1%) et le bornéol (6,3%) sont également présents en quantité appréciables. Par contre, ils avancent une faible teneur en α-pinène (3,2%) et en limonène (2,8%) **(Larabi *et al.*, 2015)**.

Plus récemment, **Djouahri *et al.*** en **2016** ont étudié la composition chimique des huiles essentielles des feuilles récoltées avant et en pleine floraison, ainsi que pendant la fructification. Les auteurs avancent que l'α-pinène (16,4 ± 0,2-31,9 ± 0,4%) et le limonène (3,4 ± 0,1-9,5 ± 0,1%) sont les composés majoritaires en période de pleine floraison, alors que le camphre (16,1 ± 0,2-26,2 ± 0,3%) et l'acétate de bornyle (15,2 ± 0,2-27,3 ± 0,3%) sont les principaux constituants pendant la période de fructification.

Enfin, une autre étude a été réalisée sur la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles du thuya du Canada dont l'α-pinène (32,7%), le 3-carène (18,3%), le β-mycène (11,7%) et l'acétate de bornyle (5,9%) sont les composés majoritaires **(Kiliç, 2014)**.

- **L'huile essentielle des parties aériennes**

Une seule étude porte sur la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes de *Tetraclinis articulata.* Très récemment, **Bouayad Alam *et al.*** en **2014** ont identifié, par CPG-SM, 54 constituants dont l'α-pinène (32,0%) est le composé majoritaire, suivi par le cédrol (11,0%), le 3-carène (9,6%), le limonène (4,3%), le sabinène (4,3%) et le *(E)*-β-caryophyllène (4,0%).

### I.5.1.2. Les activités biologiques des huiles essentielles

Des études antérieures sur *Tetraclinis articulata* ont indiqué son utilisation comme antibactérien et antifongique **(Bourkhiss *et al.*, 2007b ; Bourkhiss *et al.*, 2007c ; Djouahri *et al.*, 2014 ; Abi-Ayad *et al.*, 2011 ; Tékaya-Karoui *et al.*, 2011 ; Abi-Ayad *et al.*, 2013 ; Djouahri *et al.*, 2016)**, cytotoxique **(Branen *et al.*, 1975 ; Buhagiar *et al.*, 1999),** antioxydant et anti-inflammatoire **(Bourkhiss *et al.*, 2010b ; Djouahri *et al.*, 2013a ; El Jemli *et al.*, 2016 ; Sliti *et al.*, 2016 ; Djouahri *et al.*, 2016)**.

**- Bouayad Alam *et al.* (2014)** ont constaté que l'huile essentielle des parties aériennes de *Tetraclinis articulata* est très active contre cinq mycètes (*F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *penicillium* sp.1 et *penicillium* sp.2) avec des pourcentages d'inhibition variant entre 57,77% et 84,44% à une très faible concentration de l'ordre de 5 µg/mL.

- **Bourkhiss *et al.* (2010a)** ont réalisé une étude sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la sciure du bois vis-à-vis de quatre souches bactériennes et trois souches fongiques. Cependant, les microorganismes étudiés n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle. Chez les bactéries, *Bacillus subtilis et Micrococcus luteus* sont les plus sensibles, inhibés à une concentration de 1/10000 (v/v), par contre *Escherichia coli et Staphylococcus aureus* se sont révélés moins sensibles, inhibés à une concentration de 1/5000 (v/v). Pour les souches fongiques, cette huile essentielle s'est avérée également active contre *Penicillium parasiticus* et *Aspergillus niger* (1/2000 (v/v)) tandis que *Trametes pini* était également sensible, mais inhibé à 1/1000 (v/v).
- L'huile essentielle du bois a également été testée pour son activité antimicrobienne contre quatre espèces différentes de bactéries, à savoir : *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* et *Streptococcus*. Ces souches bactériennes se sont montrées très sensibles avec une CMI de l'ordre de 1,25 µL/mL **(El Moussaouiti *et al.*, 2010)**.
- Les huiles essentielles des feuilles et des cônes du thuya sont testés vis-à-vis d'*Echerichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* et *Staphylococcus aureus*. Ces microorganismes se sont avérées très sensibles à ces huiles essentielles avec des CMIs variant entre 0,2 et 1,0 µg/mL **(Chikhoune *et al.*, 2013)**.
- Les résultats obtenus par **Bourkhiss *et al.* (2007b)** montrent que l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) présente une activité inhibitrice très importante, *in vitro*, vis-à-vis de quatre bactéries et deux champignons testés. *Staphylococcus aureus* a montré une plus grande sensibilité, inhibée à une concentration de 1/5000 (v/v). Il est à noter également qu'aussi bien *Escherichia coli* que *Bacillus subtilis* ont présenté la même vulnérabilité à cette essence avec *Pénicillium parasiticus* et *Aspergillus niger* (1/500 (v/v)). En revanche *Micrococcus luteus* est inhibé à partir de la concentration de 1/1000 (v/v).
- **Abi-Ayad *et al.* (2011)** ont réalisé une étude sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de thuya. Les résultats de la méthode de diffusion sur disque, suivi des mesures de la concentration inhibitrice minimale (MIC), indiquent que *Bacillus cereus* était le microorganisme le plus sensible avec la zone d'inhibition la plus élevée 60,5 mm et une CMI de l'ordre de 5 µL/mL. En revanche, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* se sont révélés plus résistants inhibées à des CMIs variant entre 7,5 et 10 µL/mL.
- **Abi-Ayad *et al.* (2013)** ont étudié l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de thuya vis-à-vis d'*Aspergillus flavus, Aspergillus niger* et *Fusarium sp*. La plus importante activité a été rapportée contre les espèces de *Fusarium sp.*, avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 94 et 100% au bout de 6 jours, à une concentration de 15 et 20 µL/mL,

respectivement, suivi par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* inhibé respectivement à 64 et à 62% à une concentration de 15 µL/mL.

- L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata* a été testée *in vitro* vis-à-vis de quatre souches bactériennes et deux champignons filamenteux. Seul *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* se sont révélés sensibles, inhibés à des concentrations modérées de l'ordre de 1/250 et 1/100 (v/v), respectivement **(Bourkhiss *et al.*, 2007a)**.

- L'huile essentielle de la sciure du bois du thuya et ses fractions ont été testées *in vitro* contre quatre bactéries, à savoir : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* et trois champignons filamenteux : *Penicillium parasiticus*, *Aspergillus niger* et *Trametes pini*. La fraction sesquiterpénique hydrocarbonée s'est révélée sans effet vis-à-vis de toutes les souches fongiques et présente la plus faible activité en inhibant les quatre bactéries à la concentration de l'ordre de 1/100 (v/v). Par contre, l'huile essentielle brute et les différentes fractions oxygénées montrent une action fongitoxique à des degrés variables contre les trois champignons testés et une action inhibitrice variable vis-à-vis des souches bactériennes dont la croissance est totalement inhibée à la concentration de 1/250 (v/v). La fraction oxygénée, constituée essentiellement du totarol (42,4%), est la plus efficace. En effet, les souches bactériennes *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* se sont révélées très sensibles, inhibées à une concentration très intéressante de l'ordre de 1/1000 (v/v). Par contre, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* se sont montrées plus résistants, inhibées à une concentration de 1/500 (v/v) **(Bourkhiss *et al.*, 2012)**.

- **Tékaya-Karoui *et al.* (2011)** ont testé l'activité antifongique des fractions des huiles essentielles des branches terminales ligneuses et des racines du thuya provenant de Tunisie. La meilleure activité antifongique a été notée pour la fraction de l'huile essentielle des branches terminales, très riche en nonan-1-ol (75,2%) contre *Alternaria solani*, avec une zone d'inhibition de 29,8 mm, suivi par la fraction de l'huile essentielle des racines qui contient 16,6% d'acétate de bornyle contre le même champignon, mais avec une zone d'inhibition de l'ordre de 26,0 mm.

- **Bourkhiss *et al.* (2010b)** ont comparé l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des huiles essentielles des feuilles, des rameaux et de la sciure du bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. Les huiles essentielles du bois et des feuilles, plus riches en phénols totaux (470,12 ; 320,54 mg EAG/g HE), ont manifesté un important potentiel antioxydant, avec les trois méthodes utilisées, supérieur à celui du composé de référence (butylhydroxytoluène ou BHT). Par ailleurs, les trois organes, particulièrement le tronc, ont montré une activité anti-

inflammatoire considérable avec une $CI_{50}$ de 10,71 µg/mL, mais cette activité reste inférieure à celle de l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) ($CI_{50}$ = 0,7 µg/mL) utilisé comme contrôle positif.

- **Ben Jemia *et al.* (2012)** ont étudié l'activité antioxydante de l'huile essentielle et de l'extrait acétone/eau (80%) des feuilles de thuya provenant de Tunisie. Le pouvoir antioxydant des échantillons a été déterminé par quatre tests, à savoir : le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le blanchiment du β-carotène, le pouvoir chélateur des ions ferriques et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP). Les résultats du test DPPH ont montré que la plus forte activité antioxydante a été obtenue pour l'extrait acétone/eau, avec une $CI_{50}$ de l'ordre de 5,5 µg/mL, deux fois plus importante que le contrôle positif (BHT) ($CI_{50}$=12,0 µg/mL).
- L'activité antioxydante des huiles essentielles des feuilles et des cônes de thuya a été également évaluée par **Chikhoune *et al.*** en **2013**. Ils rapportent aussi de très faibles activités par rapport aux composés de référence. En effet, les pourcentages d'inhibition obtenus par le test de DPPH, varient entre 0,7 ± 0,0 et 11,6 ± 1,0% contre 91,1 ± 0,1% pour BHT et 93,5 ± 0,1 pour BHA.
- En outre, **Herzi *et al.* (2013)** ont évalué l'activité antioxydante des huiles essentielles des feuilles de thuya extraites par différentes méthodes (hydrodistilation (HD) et l'extraction par fluide supercritique (SFE) en utilisant différentes pression (90, 280 et 1000 bar). L'huile essentielle obtenu par l'extraction par fluide supercritique à 1000 bar possède le pouvoir antioxydant le plus important avec une $CI_{50}$ de l'ordre 108,16 ± 3,07 µg/mL. Il est à noter que cette huile est la plus riche en composés phénoliques 267,90 EAG mg/g. L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation, très pauvre en composés phénoliques 8,89 EAG mg/g, présente la plus faible activité antioxydante, avec une valeur de $CI_{50}$ de 3681,49 ± 69,33 µg/mL.
- Par ailleurs, **Djouahri *et al.*** en **2013a** ont étudié les activités antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des feuilles de thuya d'Algérie obtenues par deux méthodes : Hydrodistillation conventionnelle (HD) et hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAHD). L'huile essentielle obtenue par MAHD a montré des activités antioxydantes plus élevées (DPPH, $CI_{50}$ : 191,72 ± 1,22 µg/mL contre 517,65 ± 1,21 µg/mL ; FRAP, $CE_{50}$ : 30,19 ± 0,15 µg/mL contre 45,12 ± 0,14 µg/mL). Le résultat du pouvoir antioxydant obtenu par FRAP est comparable au composé de référence (α-tocophérol, $CE_{50}$ = 30,55 ± 0,14 µg/mL). Par contre, l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation a montré une activité anti-inflammatoire plus intéressante que le témoin positif utilisé. Cette activité a été déterminée par deux méthodes : inhibition de la lipoxygénase et inhibition de la xanthine oxydase. Les

résultats obtenus en pourcentages sont respectivement : 72,55 ± 0,14 contre 79,88 ± 0,13 ; NDGA : 80,34 ±0,72 et 61,56 ± 0,19 contre 74,95 ± 0,15 ; allopurinol : 75,43±0 ,49.

Récemment, **Djouahri *et al.*** en **2015** ont étudié également les activités antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des feuilles et du bois de thuya d'Algérie récolté dans quatre régions (Zeddine, Aïn Defla ; Mansoura, Bordj-Bou-Arreridj ; Zekkar, Djelfa et Tazoult, Batna). Ces auteurs avancent une très faible activité antiradicalaire de ces huiles essentielles. En effet, les $CI_{50}$ obtenues par le test du DPPH varie entre 88,44 ± 3,27 et 119,44 ± 5,25 µg/mL, nettement inférieures à celles des antioxydants standards (BHA : $CI_{50}$= 24,73 ± 0,11 µg/mL ; BHT : $CI_{50}$= 33,89 ± 0,16 µg/mL). De même, les résultats du pouvoir antioxydant obtenus par FRAP mettent en évidence une activité très faible par comparaison aux témoins positifs, avec des valeurs de $CE_{50}$ variant entre 31,12 ± 1,04 et 57,49 ± 1,36 µg/mL, contre 15,49 ± 0,13 µg/mL pour BHA et 16,65 ± 0,18 µg/mL pour BHT. Parallèlement, ces mêmes auteurs ont déterminé l'activité anti-inflammatoire par deux méthodes : inhibition de la lipoxygénase et inhibition de la xanthine oxydase. Ces huiles essentielles ont présenté également une faible activité par comparaison aux anti-inflammatoires standards. Les résultats obtenus sont respectivement, $CI_{50}$ varient entre : 2,51 ± 0,23 et 25,93 ± 0,16 µg/mL contre 0,61 ± 0,02 µg/mL pour NDGA ; 6,54 ± 0,25 et 29,4 ± 0,19 µg/mL, contre 2,45 ± 0,19 µg/mL pour allopurinol.

Enfin, très récemment, **El Jemli *et al.*** en **2016** ont étudié les pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire des huiles essentielles des feuilles de thuya prélevées dans la région de Marrakech. Ils rapportent une activité anti-inflammatoire intéressante. En effet, l'administration orale de ces huiles essentielles à une dose de 200 mg/kg entraîne après trois heures, une réduction significative de l'œdème induit par l'injection du carraghénane dans la patte du rat. Le pourcentage d'inhibition est équivalent à 68,42 ± 8,0% comparable à celui du composé de référence (indométhacine, 72,63%). Par contre, ces mêmes huiles essentielles présentent une faible activité antioxydante, avec une $CI_{50}$ obtenue par le test de DPPH, de l'ordre de $12{,}05\times10^3$ ± 0,24 µg/mL, nettement supérieure à celle du standard ($CI_{50}$ = 4,20 ± 0,02 µg/mL). De même, le pouvoir antioxydant obtenu par FRAP a montré une activité très faible par comparaison au témoin positif, avec une valeur de $CE_{50}$ de $0{,}15\times10^3$ ± 0,01 µg/mL, contre 7,02 ± 0,02 µg/mL pour BHT.

### I.5.2. Les extraits

**- Djouahri et Boudarene** en **2012** ont évalué les activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits méthanoliques, chloroformique et d'acétate d'éthyle des feuilles de thuya. La

fraction méthanolique qui est la plus en composés phénoliques (156,63 ± 0,79 mg EAG /g d'extrait brut) a montré une inhibition puissante du radical DPPH•, avec une $CI_{50}$ de l'ordre de 28,55 ± 0,83 mg/mL, supérieure à celles des témoins positifs (α-tocophérol, $CI_{50}$ = 33,49 ± 1,94 mg/mL ; acide ascorbique, $CI_{50}$ = 31,48 ± 1,37 mg/mL). De même, la fraction méthanolique a présenté une activité anti-inflammatoire considérable avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 87,25 ± 0,45%, comparable à celle du témoin positif (NDGA, 80,34 ± 0,72%).

Ces mêmes extraits ont été testés pour leur activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs souches microbiennes, à savoir : *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Fusarium culmorum, Aspergillus ochraceus, Aspergillus flavus* et *Candida albicans*. *Listeria monocytogenes* s'est révélé la plus sensible à l'ensemble des extraits avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 44,67 ± 1,53 mm et 53,00 ± 1,00 mm. Par contre, toutes les fractions testées n'ont donné aucune activité vis-à-vis des souches microbiennes suivantes : *Klebsiella pneumoniae, Fusarium culmorum, Aspergillus ochraceus, Aspergillus flavus* et *Candida albicans* **(Djouahri *et al.*, 2013b)**. De même, l'extrait hydro-méthanolique obtenu à partir des cônes de thuya a révélé des activités antioxydante et anti-inflammatoire très importantes **(Djouahri *et al.*, 2014)**.

- **Aouinty *et al.*** en **2006** ont étudié l'activité insecticide des extraits aqueux vis-à-vis des larves de stades 2 et 4 de : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). Ils ont rapporté des effets plus efficaces sur les larves du deuxième stade (L2) que sur celles du quatrième stade (L4), avec des concentrations létales ($CL_{50}$), variant entre 110 mg/L et 220 mg/L après 24 heures d'exposition. Ainsi, dans le cadre de la lutte anti-moustique, ces extraits peuvent être utilisés comme des biocides naturels.

- **Zidane *et al.*** en **2014** ont étudié les effets vasorelaxants de plusieurs extraits des brindilles de thuya du Maroc oriental (région de Tafoughalt). Les extraits méthanolique et d'acétate éthylique ont montré un important effet vasorelaxant en induisant une relaxation de la contraction provoquée par phényléphrine sur aorte intacte du rat. Ceci est du la présence considérable de composés phénoliques dans ces extraits, tels que : amentoflavone, myricitrine et la quercitrine. Ce qui explique l'utilisation traditionnel des brindilles de thuya contre le traitement de l'hypertension citée précédemment.

### I.5.3. Autres études sur *Tetraclinis articulata*

**- Abbas *et al.*** en **2006** ont étudié la présence des champignons mycorhiziens arbusculaires dans sept tetraclinaies marocaines. Les examens microscopiques des racines de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters ont révélé la présence, dans tous les échantillons, des endomycorhizes arbusculaires ; aucune ectomycorhizes n'a été détectée. Toutes les spores appartiennent à l'ordre des Glomineae, représenté par deux familles : Glomaceae et Acaulosporacea. Le genre *Glomus*, le plus dominant, est représenté par cinq espèces (*Glomus aggregatum*, *Glomus constrictum*, *Glomus* sp. 1, *Glomus* sp. 2, et *Glomus* sp. 3) alors que le genre *Acaulospora* est représenté par une seule espèce non identifiée.

- Enfin, en **2009**, **Achak *et al***. ont étudié la composition organique et minérale des feuilles de *Tetraclinis articulata*. Ils rapportent une teneur élevée en lipides et en cires de l'ordre de 6,7 et 6,0%, respectivement. Alors que le contenu en protéines est très faible, avec un pourcentage de 0,4. Par contre, les feuilles de thuya sont très riches en calcium (487 mg/Kg de matière sèche), suivi par Mg (35 mg/Kg), S (20 mg/Kg) et Si (18 mg/Kg). Elles contiennent également de faibles quantités en Al, Fe, Zn et Cu avec des valeurs variant entre 3 et 8 mg/Kg.

# Chapitre II : Les différentes techniques d'extraction et d'analyse des constituants d'un mélange naturel

## I. Techniques d'extraction des constituants d'un mélange naturel

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de plusieurs techniques, le choix de ces derniers dépend de la localisation histologique de l'huile dans le végétal et de son utilisation **(Marouf et Tremblin, 2009)**. Certains auteurs les classifient en deux groupes : Les méthodes conventionnelles dites classiques et les méthodes innovantes.

### I.1. Les méthodes conventionnelles

#### I.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'un des procédés d'extraction les plus anciens, elle demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les obtenir aisément. Historiquement, Avicenne (980-1037) a été le premier à développer l'extraction avec un alambic pour obtenir l'huile essentielle pure de la rose.

L'hydrodistillation par le système Clevenger est recommandée par la troisième édition de la Pharmacopée Européenne pour la détermination des rendements en HE. Ce système permet le recyclage des condensats par un système de cohobation **(Bohra *et al.*, 1994 ; Asbahani *et al.*, 2015)**. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité **(Bruneton, 1993 ; Ferhat *et al.*, 2010)**. Le chauffage permet l'éclatement des glandes contenant l'huile essentielle dans la structure végétale puis la libération des molécules volatiles.

La turbodistillation est une variante optimisée de cette technique, elle a l'avantage de réduire le temps de distillation, de la consommation énergétique et d'obtenir des rendements élevés. Par ailleurs, c'est une technique de choix pour les épices ou les bois dont les huiles essentielles sont difficiles à extraire **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

#### I.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

C'est le moyen le plus répandu pour l'obtention des huiles essentielles dans les entreprises de petite taille et plus généralement dans l'industrie. Contrairement à l'hydrodistillation, il n'y a pas de contact direct entre la matière végétale et l'eau et c'est la vapeur ascendante qui est le vecteur d'extraction (**Figure 2**) **(Masango, 2005)**.

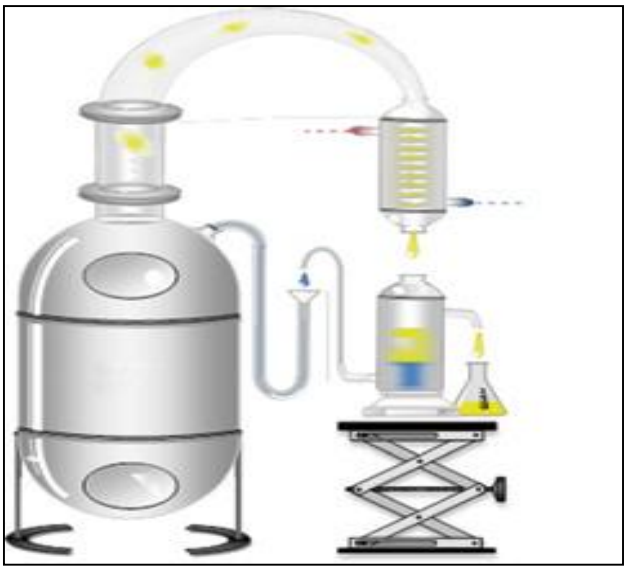


**Figure 2 : Description schématique de système d'extraction par l'entraînement à la vapeur (Li *et al.*, 2014)**

**I.1 3. Extraction au moyen de solvants**

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont les composés aromatiques sont extraits par l'éthanol (concrètes et absolues). L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants **(Chemat, 2009)**.

**I.1.4. Le pressage à froid**

Le pressage (ou expression) à froid constitue avec l'hydrodistillation/entraînement à la vapeur, une autre possibilité pour obtenir les huiles essentielle. Elle est essentiellement utilisée pour extraire les huiles essentielles à partir des fruits d'agrumes car les glandes sont localisées sur les parties externes du fruit (écorce). Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits **(Marouf et Tremblin, 2009)**. Les huiles essentielles sont obtenues par pression à froid, forment une émulsion aqueuse et doivent être récupérées par centrifugation **(Ferhat *et al.*, 2007)**.

**I.2. Les méthodes innovantes**

A l'heure où « rapidité, efficacité, et sélectivité » sont devenues les caractéristiques principales d'une extraction idéale, de nouvelles technologies, sont depuis quelques années utilisées dans le domaine de l'extraction des huiles essentielles. Ces techniques permettent

d'obtenir des extraits de qualité équivalente mais dans des délais plus courts par rapport à ceux des techniques traditionnelles **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

### I.2.1. Extraction assistée par les ultrasons

Le procédé traditionnel d'extraction peut fournir des rendements faibles, l'hydrodistillation assistée par les ultrasons peut contribuer à améliorer l'efficacité de l'extraction d'huiles essentielles et diminuer ainsi considérablement le temps d'extraction. Les effets mécaniques des ultrasons fragilisent les parois cellulaires du végétal, facilitant la libération de leur contenu, améliorant le transfert de matière. Ces phénomènes sont ainsi à l'origine de l'efficacité de l'apport des ultrasons dans les procédés d'extraction **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

### I.2.2. Extraction assistée par les micro-ondes

Les micro-ondes, sont des ondes électromagnétiques non ionisantes. Les fréquences se situent dans un domaine allant de 300 MHz à 300 GHz, ce qui correspond à une longueur d'onde de 1 mm à 1 m. La première technique d'extraction des huiles essentielles sous chauffage micro-ondes a été proposée en 1989 par Craveiro *et al.*. Elle repose sur le principe de l'entraînement à la vapeur et utilise de l'air comprimé à la place de la vapeur pour extraire des huiles essentielles. L'hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulsé a donc vu le jour en 1994 par la société Archimex, s'affranchit de l'utilisation de l'eau. En 2004, l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes a été développée et brevetée par Chemat *et al.*, elle permet de réaliser des extractions de produits naturels à pression atmosphérique et sans solvant. Récemment, un procédé d'hydrodistillation assistée par micro-ondes et gravité original et différent des anciennes méthodes a été proposé et breveté par Chemat *et al.* en 2008. Cette technique repose sur une extraction écologique des composés naturels par micro-ondes, suivie d'une récupération des composés désirés par simple écoulement de la phase liquide extraite à l'aide de la gravité naturelle **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

Cette technique présente donc beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, reproductible et facile à mettre en œuvre. Toutefois, il ne s'agit pas d'une huile essentielle mais d'un extrait (**Figure 3**).

**Figure 3 : Extraction par micro-onde sans solvant (Li *et al.*, 2014)**

### I.2.3. Extraction par $CO_2$ supercritique

Le dioxyde de carbone est habituellement le plus utilisé comme solvant d'extraction des huiles essentielles puisque sa pression critique relativement basse (74 bar) pour une température proche de la température ambiante (32 °C). Le $CO_2$ est chimiquement inerte et non toxique, inflammable, disponible en haute pureté à un coût relativement faible et contrairement aux solvants, il est facilement ôté des extraits. Dans l'état supercritique, le $CO_2$ présente une polarité comparable à celle du pentane qui le rend approprié pour l'extraction des composés apolaires ou lipophiles **(Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007 ; Zhao *et al.*, 2014)**.

Le $CO_2$ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après, le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux afin d'être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (**Figure 4**) **(Chemat, 2009)**. Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité **(Wenqiang *et al.*, 2007)** et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante. Elle demeure toutefois, encore couteuse et nécessite des précautions dues à la pression d'utilisation.

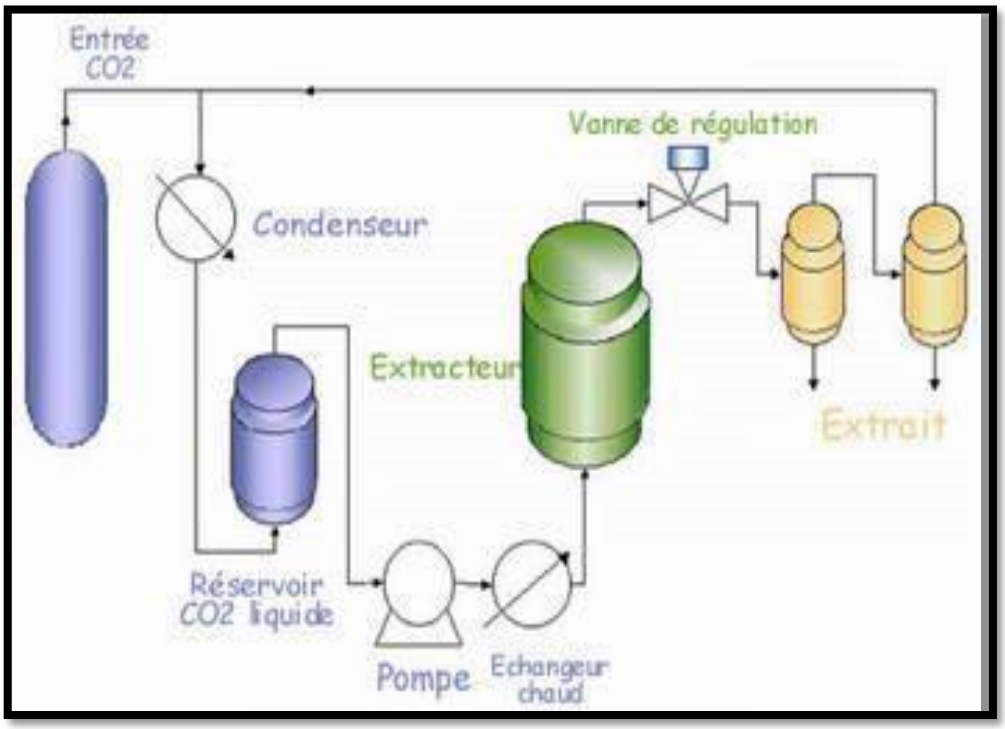
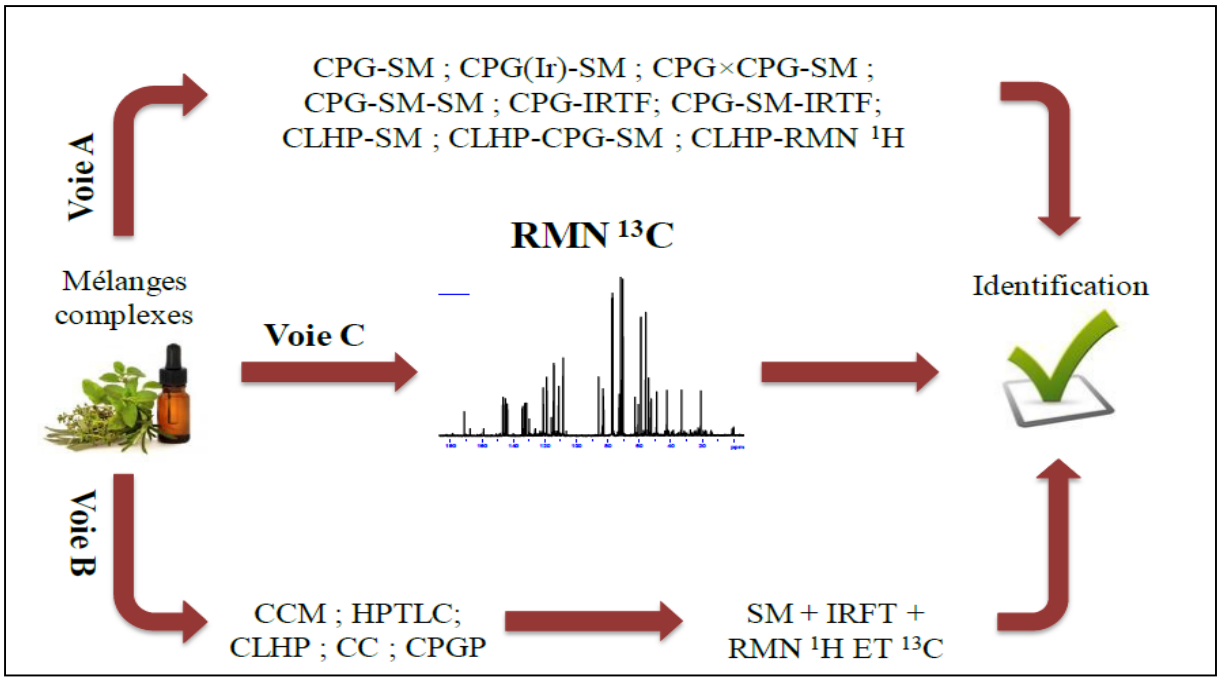



**Figure 4 : Schéma descriptif du dispositif d'extraction par $CO_2$ supercritique (Fillatre, 2011)**

## II. Identification des constituants dans un mélange complexe

Les produits naturels d'origine végétale - extraits, huiles essentielles, résines- sont de nos jours très recherchés. Ils se présentent pratiquement toujours sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines -voire d'une centaine et plus- de composés en proportions variables. Ces produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée à différents secteurs d'activité tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire. De plus, dans le domaine industriel, les molécules qui peuvent en être isolées, dans la plupart des cas optiquement actives, constituent des substrats intéressants pour l'hémi-synthèse de produits pharmaceutiques, de vitamines, de substances odorantes, etc **(Bruneton, 1993)**.

Cependant, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel demeurent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation conjointe de plusieurs techniques analytiques complémentaires **(Joulain, 1994 ; Coleman et Lawrence, 1997)**. L'analyse de la composition chimique d'un mélange naturel s'effectue de manière conventionnelle selon les voies A ou B (**Figure 5**).




CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ; SM : Spectrométrie de Masse ; IRTF : Infra -Rouge à Transformée de Fourier ; CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance ; RMN : Résonance Magnétique Nucléaire ; CCM : Chromatographie sur Couche Mince ; CC : Chromatographie sur Colonne ; CPGP : Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative ; HPTLC : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance.

**Figure 5 : Méthodes d'analyse d'un mélange complexe (Nam, 2014)**

L'analyse peut également être menée selon la voie C (**Figure 4**) qui met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN $^{13}C$) pour l'identification des composés en mélange sans séparation préalable ou précédée d'une étape de fractionnement réduite au minimum. Cette technique peut en outre être employée pour la quantification des constituants si nécessaire.

### II.1. Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A

La voie A met en œuvre le couplage « en ligne » des techniques chromatographiques et spectroscopiques.

#### II.1.1. CPG et les indices de rétention

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique d'analyse très répandue, utilisée depuis le milieu du siècle dernier. Elle s'est rapidement imposée de par son coût relativement modéré, son automatisation, sa robustesse. La CPG, mettant en œuvre des colonnes capillaires, est couramment utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Elle permet l'individualisation d'un grand nombre de constituants et leur détection même quand ils sont présents dans un échantillon en quantité inférieure au nanogramme.

Son principe est basé sur la séparation de composés gazeux selon leurs affinités pour la phase stationnaire (colonne). L'analyse de composés liquides ou solides impose donc de pouvoir les amener à l'état gazeux par chauffage. Chaque composé du mélange va parcourir la colonne et sortir à des temps différents (temps de rétention). Celui-ci dépend de nombreuses conditions opératoires : le type de colonne (nature de la phase stationnaire, longueur…) et les conditions analytiques (débit du gaz vecteur, température…), ce qui rend son emploi délicat pour l'étude de mélanges complexes comme les huiles essentielles. Dans ce cas, il est recommandé de se servir des indices de rétention qui permettent de s'affranchir de cette variabilité. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcanes linéaires à température constante (Indice de Kováts, IK) **(Kováts, 1965)** ou bien en programmation de température (Indices de Rétention, Ir) **(Van den Dool et Kratz, 1963)**. En effet, l'indice de rétention (Ir) ne dépend que de la nature de la phase stationnaire, il est alors possible d'utiliser des bases de données pour tenter d'identifier le constituant **(Fernandez et Chemat, 2012)**. Il faut cependant, noter que deux composés différents peuvent présenter les mêmes indices sur colonne polaire et apolaire. De ce fait, cette technique ne doit pas être utilisée seule pour l'identification. Aussi, dans le but de rendre plus fiable l'identification des constituants d'un mélange naturel, divers couplages associant la CPG à des techniques spectroscopiques ont été développés.

### II.1.2. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique

#### II.1.2.1. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN)

Le couplage de la CPG avec la spectrométrie de masse (SM) en mode impact électronique (IE) est probablement le plus répandu dans les laboratoires d'analyses. Ce couplage a l'avantage, dans la majorité des cas, de fournir des informations concernant la masse molaire d'un composé et d'autre part d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales **(Masada, 1976 ; Jennings et Shibamoto, 1980 ; Sandra et Bicchi, 1987; Mc Lafferty et Stauffer, 1994; Adams, 1989 et 2001 ; Joulain et König, 1998)**. En règle générale, l'utilisation de la bibliothèque de spectres réalisée au sein du laboratoire permet d'obtenir des résultats plus fiables, ceci est particulièrement vrai pour l'analyse des huiles essentielles comprenant un grand nombre de sesquiterpènes, qui, construits à partir d'un même synthon isoprénique, présentent des spectres de masse souvent identiques ou insuffisamment différenciés.

Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) (**Lange et Schultze, 1988 ; Schultze *et al.*, 1992 ; Paolini *et al.*, 2005)**. L'ICP et l'ICN produisent des ions quasi-moléculaires dont l'observation donne accès à la masse molaire des composés. Ainsi, la SM-ICP a permis de différencier les quatre stéréo-isomères de l'isopulégol **(Lange et Schultze, 1988)**. Toutefois, cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules possédant des structures très proches. C'est le cas par exemple du géraniol et du nérol, qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une des doubles liaisons. En effet, ils possèdent des spectres de masse ICN identiques **(Bruins, 1979)**. Il faut également prendre en compte la difficulté d'obtenir des spectres, en SM (ICN) ou en SM (ICP), reproductibles d'un laboratoire à l'autre. C'est pourquoi, cette technique doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles **(Zupanc *et al.*, 1992)**.

La CPG bidimensionnelle (CPG x CPG ou CPG-2D) est également une technique particulièrement intéressante. En effet, l'utilisation de deux séparations consécutives sur deux colonnes de natures différentes, entraîne une diminution, voir une suppression, des coélutions contrairement à la CPG-1D. Grâce à cette technique chromatographique, **Filippi *et al.* (2013)** ont pu identifier 135 composés dans l'huile essentielle de vétiver, réputée pour être l'une des plus complexes d'un point de vue analytique.

### II.1.2.2. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM

En complément de l'utilisation de la CPG-SM, un spectrophotomètre Infra Rouge par Transformée de Fourier (IRTF) peut également être couplé à la CPG. La spectroscopie infrarouge renseigne sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères par l'examen de la partie de spectre dite « des empreintes digitales ». Le spectre obtenu peut être comparé à ceux contenus dans une bibliothèque informatisée de spectres Infrarouge. Le couplage CPG-IRTF peut s'appliquer à l'analyse de diverses familles de composés : les produits pétroliers et leurs additifs, les arômes, les essences naturelles, les produits de synthèse **(Iob *et al.*, 1998; Thomaidis et Georgiou, 1999)**. Son efficacité a été démontrée notamment pour l'étude de molécules présentant des spectres de masse superposables tels que les stéréoisomères du farnésol et du menthol **(Coleman *et al.*, 1989)**. Par exemple, le couplage CPG-IRFT a permis l'identification du germacrène B qui se transforme partiellement en γ-élémène dans les huiles essentielles d'orange et de pamplemousse **(Chamblee *et al.*, 1997)**. Ainsi, la CPG permet dans la grande majorité des cas une individualisation des constituants nécessaire pour une

bonne identification. Cependant, de nombreux métabolites secondaires de masse élevée donc peu volatils nécessitent l'utilisation d'une technique chromatographique en phase liquide.

**II.1.2.3. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM**

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) est une technique d'analyse et de quantification d'un grand nombre de molécules, polyvalentes et très répandues. De par la nature des constituants des huiles essentielles, la CLHP est utilisée dans de très rares cas. Il s'agit généralement de l'analyse de composés thermolabiles et/ou très polaires ou de composés peu volatils dans les essences de *Citrus*. Dans le cas d'extraits végétaux complexes, les temps nécessaires à la séparation des composés peuvent être très longs, il est alors intéressant d'utiliser une Chromatographie Ultra Haute Performance (UCLHP) plutôt qu'une CLHP **(Fernandez et Chemat, 2012)**. Le couplage CLHP-SM a été utilisé pour l'identification d'esters sesquiterpèniques, d'alcaloïdes, des xanthones, des séco-iridoïdes, dans des extraits méthanoliques mais aussi des psoralènes et des flavones à partir d'huiles essentielles **(Cremin *et al.*, 1995 ; Dugo *et al.*, 2000 ; Mroczek *et al.*, 2004)**. Il est cependant, à noter que l'utilisation de conditions opératoires très variées surtout concernant les colonnes ne permet pas des comparaisons faciles. Par exemple, la séparation par CLHP, de deux alcaloïdes : hyoscyamine et scopolamine a fait l'objet depuis le premier article publié en 1976 de plus d'une centaine de publications. Aucune standardisation n'a été proposée ou ne s'est imposée. Il s'avère donc difficile de choisir les conditions opératoires, que ce soit en laboratoire ou dans l'industrie **(Verpoorte *et al.*, 2010)**.

La Spectrométrie de Masse (SM-SM) couplée avec la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP-SM-SM) a été utilisée, en particulier, pour la détermination des traces de pesticides dans la nourriture des nourrissons **(Leandro *et al.*, 2006)** ou encore pour la détermination de la streptomycine (antibiotique, antibactérien cytostatique et cytotoxique) et ses dérivés dans le lait et le miel **(Van Bruijnsvoort *et al.*, 2004)**.

**II.1.2.4. Le couplage CLHP-CPG-SM**

De manière simplifiée, on peut considérer que le couplage CLHP-CPG-SM permet une séparation préalable des constituants du mélange en fonction de la famille à laquelle ils appartiennent (CLHP), puis l'individualisation des constituants d'une même famille (CPG), et l'identification étant réalisée par SM. Ce dispositif a permis l'identification de constituants présents à l'état de traces dans les huiles essentielles d'agrumes avec une grande fiabilité **(Munari *et al.*, 1990 ; Mondello *et al.*, 1995)**.

**II.1.2.5. Le couplage CLHP-RMN $^{1}$H**

La RMN du $^{1}$H apporte des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules, mais présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que les techniques spectroscopiques décrites précédemment (IR et surtout SM). Néanmoins, la mise en œuvre de couplage CLHP-RMN $^{1}$H a été rendu possible grâce au développement d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants (jusqu'à 23,5 Tesla), permettant ainsi d'abaisser le seuil de détection pour les composés à des valeurs de l'ordre du nanogramme. Ce couplage a aussi été rendu possible grâce au développement de colonnes capillaires dont la faible consommation en éluant permet d'employer des solvants deutérés, évitant ainsi d'avoir recours à des techniques d'irradiations sélectives **(Wolfender *et al*., 1998 ; Albert *et al*., 1999 ; Victoria et Elipe, 2003)**.

L'utilisation de la CLHP couplée à la RMN s'est révélée efficace pour l'identification de molécules thermosensibles responsables de l'amertume de la bière **(Pusecker *et al.*, 1999)** et de flavonoïdes dans un extrait méthanolique de feuille de *Sorocea bomplandii* du Brésil **(Andrade Fabio *et al.*, 2002)**. Plus récemment, la CLHP-RMN $^{1}$H a permis l'identification de produits de dégradation issus de l'acide 5-aminosalicylique dans un médicament générique **(Novak *et al.*, 2006)**.

**II.1.2.6. Le couplage CLHP-RMN $^{1}$H-SM**

Ce couplage permet de détecter et d'identifier des composés présents dans des échantillons biologiques complexes, dans des extraits de plantes **(Corcoran et Spraul, 2003 ; Yang, 2006)** ou encore de détecter des impuretés dans un médicament **(Lindon *et al*., 2000)**. Même si ce couplage présente quelques inconvénients (utilisation de solvants deutérés comme $D_2O$, $CD_3CN$, $CD_3OD$ par exemple), l'utilisation conjointe des deux techniques spectroscopiques facilite toutefois l'identification de composés.

Face à la complexité de certains mélanges, il est nécessaire de procéder en deux étapes : la purification des constituants de mélanges particulièrement complexes puis leur identification, illustrée par la voie B ci-dessous.

**II.2. Identification des constituants après purification : Voie B**

La voie B est constituée principalement de deux étapes. Le mélange est d'abord fractionné à l'aide de différentes techniques chromatographiques, telles que la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM) ou la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC), la CLHP et la CPG préparative (CPGP), précédées ou non d'une distillation fractionnée ou d'une cristallisation.

Les différents constituants isolés dans des fractions enrichies sont ensuite identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles des composés de référence (spectre de masse, spectre IR, spectres de RMN $^{1}H$ ou $^{13}C$, éventuellement RMN bidimensionnelle). Cette voie se révèle extrêmement fiable mais elle peut s'avérer coûteuse en temps particulièrement lorsque les molécules isolées sont déjà décrites dans la littérature.

Cette voie d'analyse en deux étapes (purification-identification) a été la première à être utilisée dans le domaine des huiles essentielles. L'analyse par les couplages en ligne (voie A), plus rapide, s'est ensuite imposée. Cette voie est néanmoins toujours utilisée dans le cas d'huiles essentielles complexes car sa grande fiabilité compense l'investissement en temps qu'elle requiert. Les travaux de **Weyerstahl *et al*., 1996 ; 1997a ; 1997b ; 1998 ; 1999a ; 1999b ; 2000a ; 2000b ; 2000c)** illustrent parfaitement l'intérêt pour cette séquence à travers l'étude de la composition chimique de diverses huiles essentielles très complexes. C'est le cas de l'huile essentielle de vétiver d'Haïti, qui est composée de nombreux sesquiterpènes aux propriétés physico-chimiques et spectroscopiques voisines. Une partition acido-basique a alors été réalisée. La partie neutre a été soumise à une distillation fractionnée qui a permis de séparer les produits lourds des produits légers, puis les différents constituants ont été séparés par CC répétitives, puis éventuellement par CCM. Ces constituants ont ensuite été analysés par CPG-SM, RMN $^{1}H$ et parfois par RMN $^{13}C$. La partie acide a été soumise à une réaction d'estérification ou de réduction avant la séparation des constituants. Près de 170 composés sesquiterpéniques (mono- ou poly-fonctionnalisés) ont ainsi été identifiés. Certains de ces composés possèdent des squelettes originaux et rares tels que prézizaane, zizaane, khusiane, cyclopacamphane, spirovétivane, épi-, seco- et noreudesmanes, oppositane, etc.

Parmi les travaux récents, **Delort et Jacquier (2009)** ont analysé par CPG-SM et par RMN $^{13}C$ chaque fraction obtenue après séparation par chromatographies répétitives de l'huile essentielle de fruits de *Citrus australasica*. Les auteurs ont identifié 195 composés (majoritairement le limonène et l'isomenthone) dont 4 nouveaux esters menthaniques.

Si la voie A, grâce à sa rapidité, est particulièrement adaptée aux analyses de routine, la voie B garantit l'identification des composés. Cependant, les diverses étapes de fractionnement et de purification demandent souvent un important investissement en temps. Une troisième voie, la Voie C, intermédiaire par rapport aux précédentes, puisqu'elle est basée sur l'identification et/ou la quantification par RMN $^{13}C$ des principaux composés des mélanges naturels (huiles essentielles, extraits végétaux, résines, huiles végétales, etc.), sans séparation préalable.

### II.3. Analyse par RMN du $^{13}C$ sans séparation préalable : Voie C

Les premiers travaux relatifs à l'utilisation de la RMN $^{13}C$ en tant qu'outil analytique des mélanges naturels ont été réalisés par **Formàcek et Kubeczka (1982) ; Kubeczka et Formàcek, 1984 ; 1988)**. En général, la RMN $^{13}C$ a été utilisée pour confirmer l'identification des constituants préalablement identifiés par une autre technique analytique, la CPG-SM usuellement. Dans ce contexte, dès le début des années 80, l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse a initié, puis a mis au point et développé, une véritable méthode d'analyse des mélanges complexes naturels par RMN $^{13}C$ impliquant inévitablement une informatisation de la recherche. Cette méthode est efficace, fiable et complémentaire des techniques conventionnelles **(Tomi *et al*., 1995 ; Bradesi *et al*., 1996 ; Tomi et Casanova 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009)**.

#### II.3.1. Intérêt de la RMN du $^{13}C$

En dépit de sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et d'un rapport gyromagnétique 5 700 fois moins sensible que celui du proton **(Günther, 1994)**, le $^{13}C$ est malgré tout préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes car il présente les avantages suivants :

- Le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. Donc, on observe en général dans un spectre de RMN du $^{13}C$ autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule ;
- Les spectres de RMN du $^{13}C$ peuvent être simplifiés par irradiation par découplage total des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone. En plus l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) résultant de ce découplage des protons produit une augmentation d'intensité du signal **(Williamsion et Neuhaus, 1989)** ;
- Le temps de relaxation transversal T2 (temps de relaxation spin-spin) est plus important pour le carbone que pour le proton. La largeur à mi-hauteur du signal de résonance étant inversement proportionnelle à T2, il en résulte un gain dans la finesse des pics et donc en résolution ;
- Le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste que celle du proton (schématiquement, 240 ppm par rapport à 12 ppm), ce qui améliore notablement la résolution effective c'est-à-dire la dispersion spectrale **(Tomi *et al.*, 1995)** ;

- L'enregistrement des spectres de RMN du $^{13}C$ est réalisé à température ambiante. Cela évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles ;
- La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré et soumis à d'autres analyses.

**II.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du $^{13}C$**

L'identification des constituants d'un mélange par RMN $^{13}C$ est réalisée par comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des composés de référence contenus dans une ou plusieurs bibliothèques de spectres. Avec cette méthode, les composés ne sont pas préalablement purifiés, contrairement aux précédentes techniques de couplage entre un chromatographe et un spectromètre. Pour identifier un composé au sein d'un mélange, il faut donc être à même de pouvoir observer les signaux qui lui appartiennent et de les individualiser, puis d'attribuer les déplacements chimiques à une molécule donnée. Pour cela, les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres doivent être optimisées et standardisées de façon à permettre une bonne reproductibilité des résultats obtenus. Il est également important de savoir apprécier la concentration minimale d'un produit minoritaire dans le mélange, permettant l'observation de ses signaux dans le spectre.

**II.3.2.1. Observation des signaux**

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dans le spectre d'un mélange dépend de la quantité de produit disponible, de sa solubilité et de sa viscosité dans un solvant choisi, de la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B Le manque de sensibilité (S/B) peut être pallié par :

- L'utilisation d'une cryosonde (sonde à antennes refroidies) reliée à une unité cryogénique à l'hélium. Elle permet de multiplier par 4 la sensibilité et donc de diminuer d'un facteur 16 la durée des expériences ;
- de spectromètres à haut champ puisque sa sensibilité des aimants augmente avec le champ magnétique (23,5 Tesla pour les plus performants) ;
- de convertisseurs numériques performants qui améliorent le traitement des données et de fonctions mathématiques (exponentielle) effectuées directement sur le signal de la FID (Free Induction Decay ou décroissance libre d'induction) avant la transformée de Fourrier **(Williamson et Neuhaus, 1989 ; Günther, 1994 ; Claridge, 1999 ; Hesse *et al*., 2008)**.

**II.3.2.2. Individualisation des signaux**

L'individualisation des signaux dé pend de la résolution de l'appareil de RMN, elle-même fonction de la puissance de l'aimant et des caractéristiques du système informatique

permettant l'acquisition du signal. De la même manière que pour la sensibilité, la résolution est meilleure quand on utilise un appareil à haut champ.

Divers paramètres influent sur la résolution :

- le champ magnétique : plus il est élevé, plus la séparation des signaux de résonance des différents noyaux est importante. Il en résulte une interprétation plus facile des spectres, ce qui est primordial dans le cas des études réalisées sur les composés ayant une masse moléculaire élevée (oligomères et protéines par exemple, polymère en RMN du solide), dont les spectres sont très complexes ;
- l'application d'une fonction exponentielle de Lorentz-Gauss (qui consiste à multiplier l'interférogramme par deux fonctions exponentielles de signes opposés) effectuée sur la FID préalablement à la transformée de Fourier peut également accroître la résolution des spectres **(Günther, 1994 ; Claridge, 1999)** ;
- la résolution digitale peut aussi être améliorée de manière considérable par l'utilisation de fenêtres spectrales réduites qui permettent d'enregistrer le spectre sur une largeur correspondant uniquement à la zone d'intérêt ou en plusieurs portions. Dans le domaine des lipides, du fait des nombreuses superpositions situées autour de 25, 29, 34 et 130 ppm, l'utilisation de fenêtres réduites est fréquente. Ainsi, divers auteurs ont appliqué cette méthode à l'analyse de mélanges naturels contenant des composés lipidiques (mono-, di-, triglycérides) **(Sacchi *et al.*, 1992 ; Blaise *et al.*, 1997)**. Cependant, le temps nécessaire à l'acquisition des données étant inversement proportionnel à la largeur de la fenêtre spectrale, l'enregistrement de ce type de spectres augmente considérablement le temps d'analyse.

**II.3.2.3. Attribution des signaux**

La RMN procure trois types de données spectrales qui sont : le déplacement chimique (δ), la multiplicité (*J*) et l'intensité des signaux (aire des signaux). Son intérêt réside dans sa faculté à reconnaître un noyau par rapport à son environnement dans la molécule. La fréquence de résonance des carbones et donc le déplacement chimique est très sensible à l'environnement stérique et électronique. La moindre modification structurale se traduit par des variations plus au moins importantes, mais mesurables, des déplacements chimiques de pratiquement tous les carbones de la molécule. Contrairement à la majorité des autres techniques, il est très peu probable que deux composés même s'ils possèdent des structures identiques ou très proches présentent des spectres de RMN du $^{13}C$ superposables ou insuffisamment différenciés. Il en résulte que le déplacement chimique constitue la donnée spectroscopique la plus utilisée pour identifier un composé connu dans un mélange.

Ainsi, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constituera son spectre, et en quelque sorte son empreinte digitale, à partir duquel elle pourra être identifiée. La valeur d'un déplacement chimique peut varier de manière plus au moins importante en fonction du type de solvant, de la concentration des composés et de la température. L'utilisation des spectres décrits dans la littérature récente comme données de référence pour l'identification des composés en mélange est possible. Néanmoins, afin d'obtenir une meilleure reproductibilité des déplacements chimiques, il faudrait que les conditions d'analyse des spectres des mélanges soient identiques à celle des composés de référence.

Nous détaillerons ci-dessous, quelques exemples d'utilisation de la RMN du $^{13}C$ pour l'identification des constituants de mélanges complexes, dans les domaines des huiles essentielles.

Ainsi, la RMN du $^{13}C$ a permis l'identification des principaux composés de l'huile essentielle de *Echinophora sibthorpiana* **(Ahmad et Jassbi, 1999)** et de 12 sesquiterpènes présents dans une fraction chromatographique de l'huile essentielle de bois de *Guarea guidonia* **(Núñez et Roque, 1999)**. Plus récemment, une méthode d'identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du $^{13}C$ a été développée par **Ferreira *et al.*** en **2001**. Elle est basée sur la comparaison du spectre du mélange avec des mono- et des sesquiterpènes décrits dans la littérature.

### II.3.3. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse

#### II.3.3.1. Principe de la méthode

Depuis 1989, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN du $^{13}C$ comme outil d'analyse des mélanges naturels. L'objectif à atteindre a pour but l'identification, et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans étape préalable de purification ou avec un fractionnement réduit autant que possible **(Corticchiato et Casanova, 1992 ; Tomi *et al.*, 1995)**.

La particularité de cette méthode réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques, grâce à un logiciel d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire. Effectivement, les déplacements chimiques du mélange sont directement comparés avec ceux de composés de référence présents dans des bibliothèques de spectres (**Figure 6**). L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres).

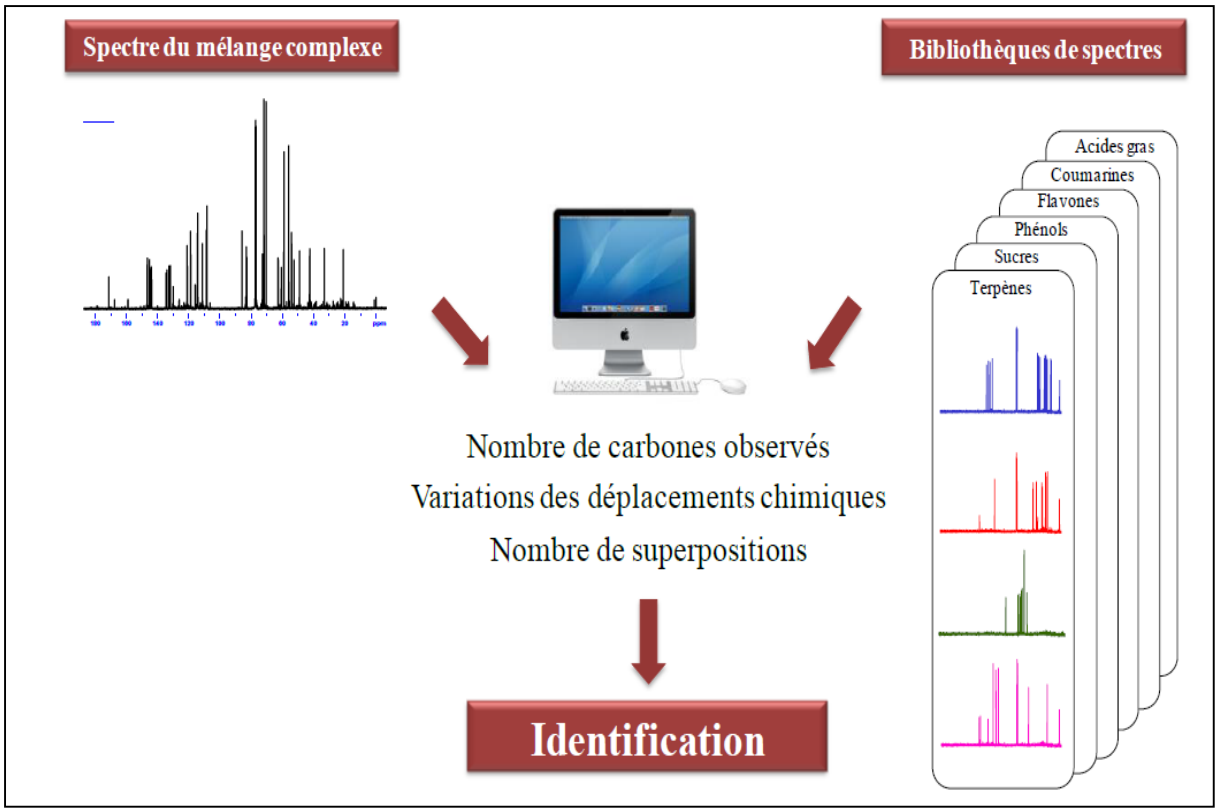



**Figure 6 : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du $^{13}C$ (Nam, 2014)**

L'identification des composés présents dans un mélange est réalisée par la prise en compte de trois paramètres directement accessibles par le logiciel :

- Le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- Le nombre de superpositions de pics qui peuvent se produire quand deux carbones appartenant à des molécules différentes présentent fortuitement le même déplacement chimique ;
- Les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ;

De plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé.

Cette méthode a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental spécifiquement adapté à chaque famille (nature du solvant, dilution, paramètres d'enregistrement des spectres). Ainsi, différentes bibliothèques de spectres ont été crées à partir de produits commerciaux et sont continuellement enrichies avec les spectres des produits isolés à partir de mélanges naturels ou bien encore préparés par hémi-synthèse.

L'utilisation de la RMN du $^{13}C$, devient particulièrement intéressante lorsqu'elle permet d'identifier rapidement et sans ambiguïté, des composés délicats à analyser par les techniques conventionnelles. Dans le domaine des huiles essentielles, des résultats très intéressants ont été obtenus par l'équipe « Chimie et Biomasse » de Corse.

- Dans un même mélange, deux douzaines de composés avaient été identifiés dans une huile essentielle avec un spectromètre pourvu d'un aimant de puissance 4,7 Tesla. L'utilisation d'un appareil fonctionnant avec un aimant de 9,4 Tesla a permis un gain pouvant atteindre 50%. Ainsi, dans le meilleur des cas une huile essentielle de *Piper bavinum* du Viêt-Nam, 38 constituants, présents avec des teneurs comprises entre 0,4 et 10% ont pu être identifiés sans aucune séparation préalable **(Lesueur *et al.*, 2009)** ;
- La teneur minimale des composés identifiables avec le spectromètre (9,4 T) est de l'ordre de 0,5%. Parfois, des composés présents à des teneurs inférieures peuvent être identifiés (0,4% et même 0,3%) ;
- En général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires (qui relaxent moins bien que les carbones liés à des protons et donnent donc un signal moins intense dans les conditions de l'expérience) appartenant aux composés minoritaires ;
- Le nombre de superpositions est limité et ne constitue pas, dans la grande majorité des cas, un facteur limitant ;
- Les variations des déplacements chimiques ($\Delta\delta$) sont généralement inférieures à 0,05 ppm pour la très grande majorité des cas. Il y a quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol, carvacrol…) dont certains carbones présentent de plus importantes variations des déplacements chimiques selon la polarité et la fonctionnalisation des autres constituants du mélange. Dans ce cas précis, une dilution permet de diminuer ces variations importantes de déplacements chimiques.

**II.3.3.2. Les domaines d'application de la RMN $^{13}C$**

L'analyse par RMN du $^{13}C$, qui allie rapidité et fiabilité, est complémentaire des techniques conventionnelles exposées précédemment dans les voies A et B. Nous rappelons ici quelques études réalisées au sein du laboratoire « Chimie et Biomasse ».

**-a- Les huiles essentielles**

L'étude de la composition chimique d'une huile essentielle peut s'avérer parfois complexe. Nous avons vu que ni la complexité ni la fonctionnalisation de la structure ne constitue un handicap pour l'identification des constituants d'un mélange naturel par RMN $^{13}C$. Au laboratoire, la méthode d'analyse basée sur la RMN $^{13}C$, utilisée en complément de la

CPG(Ir) ou en combinaison avec la CPG(Ir) et CPG-SM, a permis de caractériser un grand nombre d'huiles essentielles. Nous pouvons citer, à titre d'exemple, l'identification de :

- Quatre vingt neuf composés, dont trois acides, présentant le squelette eudesmane (acide costique, isocostique et 4-èn-ilicique) dans l'huile essentielle des parties aériennes d'*Inula graveolens* **(Blanc *et al.*, 2004)** ;
- Quatre terpènes tricycliques (longibornéol, sesquithuriférol, ferruginol, juniper cédrol) dans l'huile essentielle de racines de *Juniperus communis* ssp. *Alpina* **(Gonny *et al.*, 2006)** ;
- Sept diterpènes pour la première fois dans l'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus pinaster* Ait. de Corse (palustradiène, levopimaradiène, néoabiétadiène, labda- 8(17) ,13*(E)*-dièn-19-al, etc.) **(Ottavioli *et al.*, 2008)** ;
- Divers lactones *p*-menthaniques (mintlactone, isomintlactone, hydroxymintlactone, menthofurolactone et épimenthofurolactone) dans l'huile essentielle de *Mentha aquatica* de Corse **(Sutour *et al.*, 2011)**.

Nous avons pu voir que la RMN $^{13}C$ est une technique analytique de choix adaptée à l'étude des huiles essentielles, mais elle est également intéressante pour l'analyse délicate de mélanges naturels par les techniques conventionnelles, telles que les extraits végétaux, les résines et les huiles végétales.

**-b- Les extraits végétaux et les résines (composés lourds, acides ou polaires)**

La méthode développée au laboratoire a été également utilisée pour l'analyse de composés peu volatils présents dans des mélanges naturels très variés :

- Les triterpènes contenus dans des extraits de *Quercus suber* L. **(Castola *et al.*, 1999 ; 2002 ; 2005)** et dans un extrait de *Santolina corsica* **(Ferrari *et al.*, 2005)** ;
- Les taxanes dans des extraits d'aiguilles de *Taxus baccata* **(Duquesnoy *et al.*, 2009)** ;
- Les sucres contenus dans les miels de Corse (**Mazzoni *et al.*, 1997)** et dans les extraits de *Pinus nigra* ssp. *laricio* et *Abies alba* M. **(Duquesnoy *et al.*, 2008**) ;
- Les diterpènes acides et neutres présents dans les oléorésines de *Pinus nigra* ssp. l*aricio* **(Rezzi *et al.*, 2002 ; 2005 ; Cannac *et al.*, 2009)** ;
- Les coumarines dans un extrait dichloro-méthanique de *Peudeudanum paniculatum* de Corse **(Vellutini *et al.*, 2005)**.

Ces quelques exemples montrent le fort potentiel d'adaptation de la RMN $^{13}C$ pour l'analyse de mélanges naturels, généralement constitués de nombreuses molécules (volatiles ou non) de familles chimiques différentes.

**-c- Les huiles végétales**

Cette technique permet également, au sein des huiles végétales, d'accéder à :

- La classe lipidique, obtenue à partir de l'examen des régions des carbones glycériques et des carbonyles (mise en évidence de triglycérides, de 1,2-diglycérides et de 1,3-diglycérides) ;
- L'identification, la quantification et la distribution (sur l'entité glycérique) des différentes chaînes grasses mono et polyinsaturées ;
- Et enfin, l'évaluation des proportions des chaînes grasses isomères de position telles que la chaîne grasse oléique (C18:1$\Delta^9$) et vaccénique (C18:1$\Delta^{11}$), souvent superposées en CPG ainsi que la stéréochimie Z ou E de la double liaison.

Dans les paragraphes suivants, nous allons développer quelques cas particuliers qui confirment l'intérêt de la RMN et sa complémentarité avec les autres techniques.

**-d- L'identification de stéréo-isomères**

L'identification par RMN $^{13}$C a été utilisée au laboratoire pour l'analyse qualitative et quantitative des composés thermosensibles. A titre d'exemple, la RMN $^{13}$C a permis d'identifier et de quantifier :

- L'ascaridole et son isomère (isoascaridole) dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar **(Cavalli *et al.*, 2004a)**. En effet, une partie de l'ascaridole s'isomérise thermiquement en isoascaridole au cours de l'analyse en CPG.
- Le furanodiène et le furanoélémène dans l'huile essentielle de rhizomes et de fleurs de *Smyrnium olustrum* de Corse **(Baldovini *et al.*, 2001)**. Le furanodiène se transforme thermiquement au cours de l'analyse par CPG en furanoélémène. Les deux composés ont donc les mêmes indices de rétention et ne sont pas différenciables en CPG(Ir) et en CPG-SM.
- Les germacrènes A, B, C dans les huiles essentielles de *Cleistopholis patens* de Côte d'Ivoire. Le germacrène A subit une transformation thermique en β-élémène, rendant difficile leur quantification par CPG(Ir) dans l'huile essentielle des feuilles de *C. patens*. Il a été également observé que les germacrènes B et C se transforment respectivement en γ- et δ-élémène dans l'huile essentielle d'écorces. L'examen de l'intensité des signaux dans le spectre RMN $^{13}$C confirme la dégradation ou la transformation thermique partielle ou totale des germacrènes en élémènes. La teneur erronée des germacrènes quantifiés par CPG est corrigée par la RMN $^{13}$C **(Ouattara *et al.*, 2013)**.

**-e- Mise en évidence de la variabilité chimique**

En permettant l'identification des composés jusqu'à une teneur de 0,3-0,5%, la RMN du $^{13}$C combinée à une quantification par CPG (indices de rétention), est bien adaptée à l'étude de la variabilité chimique puisqu'elle permet d'identifier, à partir d'un spectre unique, les composés majoritaires d'une huile essentielle ou d'une résine. Elle a été appliquée avec succès à de nombreuses huiles essentielles dont *Thymus herba barona* de Corse **(Corticchiato**

***et al.*, 1998)**, *Thymus carnosus*, *T. caespititius*, *T. camphoratus* du Portugal **(Salgueiro *et al.*, 1995 ; 1997a ; 1997b)**, *Baeckea frutescens* du Viêt-Nam **(N'Guyen *et al.*, 2004)**, *Pistacia lentiscus* d'Algérie **(Mecherara-Idjeri *et al.*, 2008a ; 2008b)**, *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* d'Algérie **(Bekhechi *et al.*, 2012)** et *Tetraclinis articulata* d'Algérie **(Boussaïd *et al.*, 2015 ; 2016)**.

**-f- Analyse structurale de nouvelles molécules**

*A contrario* de ce qui a été exposé jusqu'à présent, l'analyse structurale d'un composé inconnu, c'est-à-dire non décrit dans la littérature, ne peut être réalisée qu'à partir d'un produit purifié par différentes techniques, généralement chromatographiques (CC, CCM, CLHP ou CPG). Elle requiert donc une quantité suffisante de produit pur (quelques milligrammes) afin de réaliser une étude complète par toutes les méthodes spectroscopiques habituelles (SM, IRTF, UV, RMN du $^{1}$H, RMN du $^{13}$C et RMN 2D). A partir de la combinaison de toutes ces techniques complémentaires, il est possible d'établir la structure chimique de la molécule inconnue.

De nos jours, la RMN (1D et 2D) constitue manifestement la technique analytique la plus performante et la plus utilisée pour l'élucidation structurale des molécules. La RMN 2D, en particulier, permet la mise en évidence des interactions homo- et hétéronucléaires entre les différents noyaux **(Claridge, 1999)**. Parmi les diverses séquences, les expériences de corrélation entre les différents protons d'une molécule, voisins (COSY) et à longue distance (COSY Long Range, NOESY), ou entre protons et carbones (HSQC, HMBC), fournissent des renseignements précieux sur la structure moléculaire et facilitent considérablement l'analyse structurale. La séquence de corrélation homonucléaire carbone-carbone (INADEQUATE) conduit à la structure sans ambigüité mais nécessite une quantité de produit plus importante que pour la mise en œuvre des autres séquences **(Derome, 1987)**.

Au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse, de nouvelles molécules ont été isolées et caractérisées lors de l'analyse de certaines huiles essentielles. Après séparation et purification par chromatographies successives (solide/liquide, exclusion stérique), ces molécules ont été caractérisées par les techniques spectroscopiques conventionnelles incluant la RMN du $^{1}$H, la RMN du $^{13}$C et la RMN 2D.

Ainsi, le *trans*-dauc-8-èn-4β-ol a été identifié dans l'huile essentielle de *Daucus carota* **(Mazzoni *et al.*, 1999)**, le 4-épi-*cis*-dihydroagarofurane dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* de Madagascar **(Cavalli *et al.*, 2004b)**, l'eudesm-5-èn-11-ol dans l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* de Corse **(Bianchini *et al.*, 2004)** et la modhéphanone dans une huile essentielle des racines de *Pulicaria mauritanica* d'Algérie **(Xu *et al.*, 2015)**.

En conclusion, il ressort de cette synthèse bibliographique, que la méthode mise au point et développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse, d'identification (et éventuellement de quantification) des constituants des mélanges naturels, basée sur l'analyse informatisée du spectre de RMN du $^{13}C$ du mélange, sans séparation préalable, est efficace et complémentaire des techniques conventionnelles. Elle peut être appliquée à toute sorte de mélanges naturels, contenant des composés volatils ou non volatils, huiles essentielles, résines, extraits aux solvants, biocombustibles, biocarburants, huiles végétales, miels, etc. Elle permet d'identifier et de quantifier des composés volatils ou non, des stéréo-isomères, des molécules thermolabiles, sans séparation ni dérivatisation préalable, après optimisation et validation des conditions expérimentales à chaque famille de composés.

# Chapitre III : Les activités biologiques des huiles essentielles

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabe et égyptienne, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux. Puis progressivement, ces HEs sont reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, elles agissent de manière remarquable dans la plupart des domaines de la santé et de la maladie. Ce sont des substances douées d'activités pharmacologiques beaucoup plus importantes que les plantes fraîches. Elles possèdent de nombreuses activités biologiques **(Marouf et Tremblin, 2009)**. Un certain nombre d'entre elles présentent également des propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides **(Carson et Hammer, 2011)**.

## I. Propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles

### I.1. Les antibiotiques

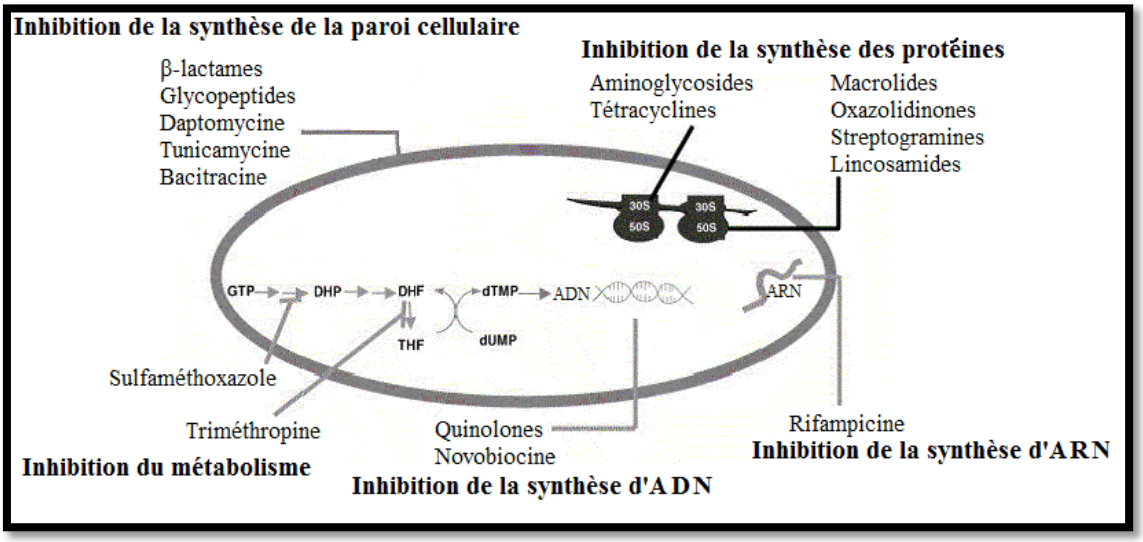
Le mot antibiotique (du grec *anti* : contre, *bioti-kos* : concernant la vie) utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un micro-organisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres micro-organismes **(Muylaert et Mainil, 2012)**.

Le mot antibiotique, introduit en 1941 par Selman Abraham Waksman, est associé à des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique **(Singh et Barrett, 2006)**. Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes, par contre les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes.

#### I.1.1. Les cibles bactériennes des antibiotiques

A partir de la découverte de la pénicilline G par Flemming en 1928, les découvertes de molécules nouvelles se sont succédées : céphalosporines, streptomycine, tétracyclines, chloramphénicol, etc. L'abondance des molécules a rendu nécessaire leur classification en familles et sous familles, en prenant d'abord en compte la structure chimique. Toutefois, les antibiotiques ont aussi été classés en fonction de leur mode d'action. On distingue quatre catégories de molécules : (i) antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, (ii) antibiotiques inhibant la synthèse des protéines, (iii) antibiotiques inhibant la synthèse de l'ADN et de l'ARN, ou bien (iv) antibiotiques entraînant la destruction de la membrane cytoplasmique (**Figure 7**).

L'action d'un antibiotique est le résultat des interactions organisme-antibiotique d'une part et antibiotique-bactéries d'autre part. Pour résumer ces dernières, on peut dire que pour être actif, un antibiotique doit pénétrer jusqu'à sa cible bactérienne, ne pas être inactivé et être capable de se lier à sa cible. Ce sont là les conditions nécessaires à l'activité antibactérienne. L'antibiotique exercera son action qui pourra être de deux types : bactériostatique s'il n'y a qu'une simple inhibition de la croissance bactérienne (blocage de la multiplication des cellules microbiennes), ou bien bactéricide s'il y a mort de la bactérie **(Gaudy et Buxeraud, 2005)**.




Avec DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate

**Figure 7 : Mode d'action des antibiotiques (El amri *et al.*, 2014)**

### I.1.2. La résistance bactérienne aux antibiotiques

- **La résistance intrinsèque**

Une résistance intrinsèque se définit comme une caractéristique fonctionnelle ou structurelle conférant une certaine tolérance, voir une insensibilité totale, à tous les membres d'un groupe de bactéries (une espèce, un genre ou parfois un groupe plus grand), vis-à-vis d'une classe antimicrobienne. L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à : (i) un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne (la faible affinité de l'acide nalidixique pour la gyrase des entérocoques), (ii) une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (imperméabilité de la membrane externe), (iii) une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques, ou encore (iv) une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique **(Muylaert et Mainil, 2012)**.

- **La résistance acquise**

C'est une caractéristique propre à quelques souches bactériennes d'un genre ou d'une espèce particulière, provoquant l'émergence et la diffusion de résistances au sein de population de germes normalement sensibles. On décrit deux phénomènes majeures à la base de l'acquisition de résistances par modification du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes. En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gène, comme par exemple les événements conduisant à l'élargissement du spectre des β-lactamases ou qui leur confèrent une résistance aux inhibiteurs de β-lactamases **(Guardabassi et Courvalin, 2006)**.

La transmission d'élément génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (**Figure 8**).

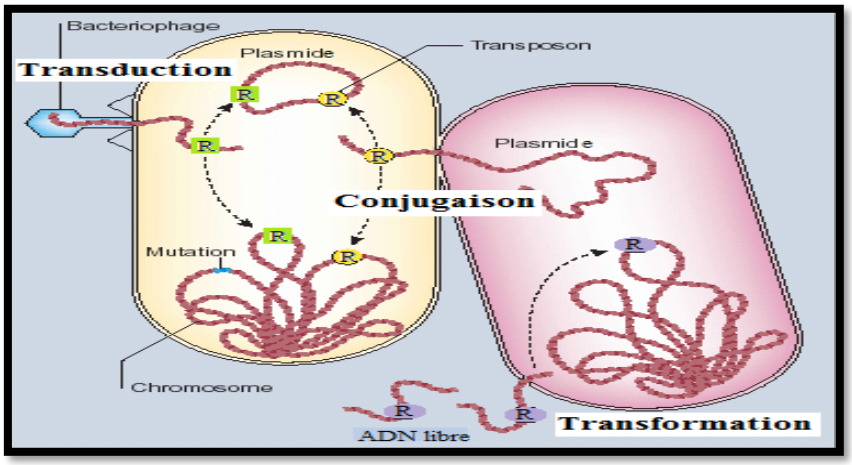



**Figure 8 : Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004)**

### I.1.3. Les mécanismes de résistance

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens **(Guardabassi et Courvalin, 2006)**. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances, les plus répandus étant la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien, l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique et l'altération de leurs cibles cellulaires **(Levy et Marshall, 2004)**. La figure 9 présente une illustration de ces différents mécanismes de résistance au sein des bactéries.

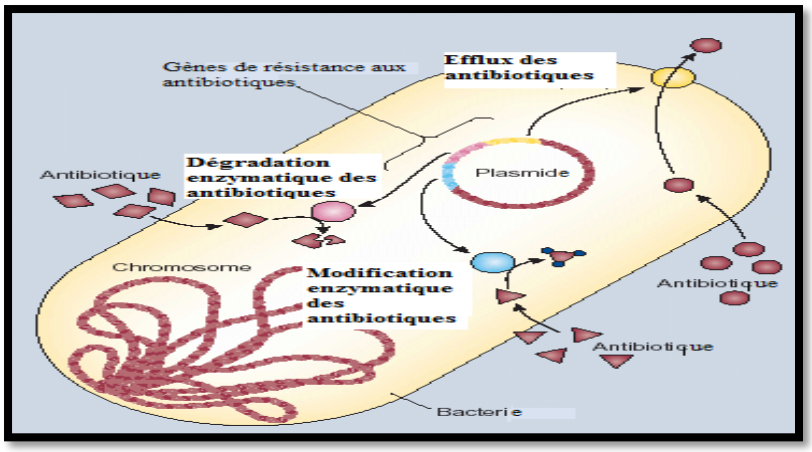



**Figure 9 : L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004)**

## I.2. Les huiles essentielles

Le terme huile essentielle (HE) dérive de « Quinta essentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelse aux extraits de plantes obtenus par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante **(Hart, 2008)**.

Les substances aromatiques naturelles, appelées essences, sont produites dans des glandes spécialisées de différentes parties des plantes : racines (iris), bulbes (ail) ou rhizomes (gingembre), elles peuvent aussi être issues des feuilles (eucalyptus, citronnelle), des fleurs (rose), des fruits (oranges), du bois (cèdre) de l'écorce (cannelle) ou encore de la plante entière (lavande).

Les huiles essentielles sont des matrices généralement complexes, renfermant des métabolites secondaires représentés par des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de leur extraction. Les HEs sont bio-synthétisées par les végétaux supérieurs en réponse à des conditions de stress et surtout pour combattre les agents infectieux ou parasitaires **(Goetz et Ghedira, 2012)**.

D'un point du vue chimique, les HEs sont constituées de composés aromatiques volatils et odorants de consistance huileuse **(Burt, 2004)**, dotées de caractères hydrophobes, solubles dans les solvants organiques et de densité inférieure à celle de l'eau **(Bakkali *et al.*, 2008)**.

### I.2.1. Les constituants des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents **(Sell, 2006)**. La plupart des composants des HEs sont inclus dans deux groupes. Il s'agit des terpènes et des terpénoïdes qui représentent la classe la plus importante et des composés aromatiques (phénylpropanoïdes) qui sont tous des composés de faible poids

moléculaire **(Bakkali *et al.*, 2008)**, synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées. Plus rarement, on peut rencontrer des composés acycliques.

**I.2.1.1. Les terpènes et les terpénoïdes**

Les terpènes $(C_5H_8)_n$ sont le plus grand groupe de substances naturelles, biosynthétiquement dérivé à partir des unités d'isoprène **(Damjanović-Vratnica *et al.*, 2011)** (**Figure 10**). Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpènes sont classés en : hémiterpènes (1 unité : C5), monoterpènes (2 unités : C10), sesquiterpènes (3 unités : C15), diterpénes (4 unités : C20), et les polyisoprènes (n unités : $C5_n$).

Un terpène qui possède un oxygène est un terpénoïde. Dans le cas des huiles, seuls sont rencontrés les terpénoïdes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, principalement les mono et les sesquiterpénoïdes et beaucoup plus rarement les diterpénoïdes (**Figure 11**). Les monoterpénoïdes sont présents dans la quasi-totalité (environ 90%) des HEs.

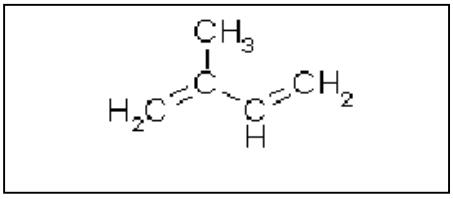



**Figure 10 : Structure de la molécule d'isoprène (Calsamiglia *et al.*, 2007)**

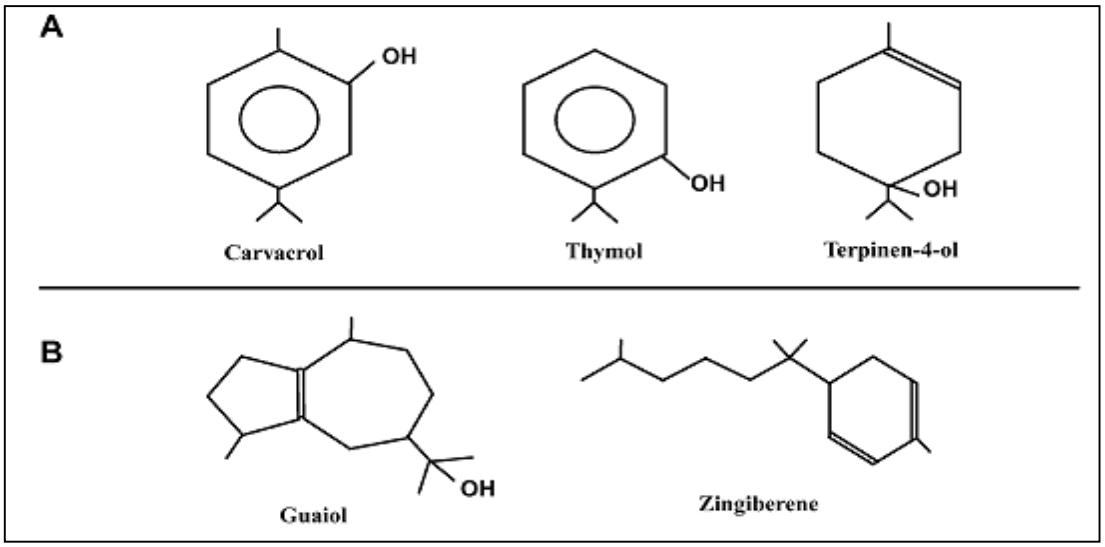



**Figure 11 : Structure de quelques composés des huiles essentielles (A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes (Calsamiglia *et al.*, 2007)**

**I.2.1.2. Les composés possédant un noyau aromatique**

Les composés aromatiques des HEs sont principalement des dérivés de phénylpropane C6-C3. Ils sont beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes. Un noyau aromatique est

couplé à une chaîne de trois carbones **(Sangwan *et al.*, 2001)**. Les plus fréquemment trouvés sont les dérivés de l'alcool cinnamique (aldéhydes, esters), des phénols (eugénol), des dérivés méthoxylés (*(E)*-anéthole) ou des oxydes cycliques (safrole) (**Figure 12**).

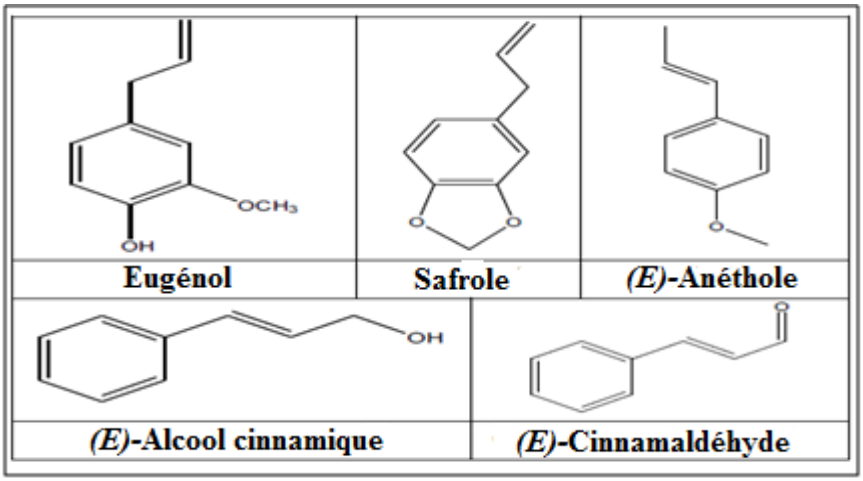



**Figure 12 : Exemple de quelques composés aromatiques C6-C3 Caractéristiques des HEs (El Haci, 2015)**

### I.2.1.3. Les composés d'origine diverses

Il existe aussi de nombreuses molécules acycliques. Il s'agit de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites molécules odorantes, comme par exemple le *(Z)*-hex-3-èn-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α-linolénique) par des voies enzymatiques **(Bruneton, 1999)**.

### I.2.1.4. Chémotype

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents, présentant des variations chimiques de leur métabolite secondaire en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement, biotope, etc.), bien que leur morphologie ainsi que leur génétique ne soient pas substantiellement transformées **(Shama *et al.*, 2011)**. La définition d'un type chimique ou chémotype ne peut reposer sur l'étude de quelques individus, mais nécessite un échantillonnage conséquent pour qu'il soit statistiquement représentatif (variabilité intra-station, variabilité inter-station, stabilité dans le temps,…).

L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* présente dans le sud de la France. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont nettes et ont lieu au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le géraniol, l'α-terpinéol, le thuyanol-4, le linalol, le carvacrol ou le thymol **(Thompson *et al.*, 2003)**. Bien que fréquemment trouvé chez les

thyms et plus généralement dans les labiées, ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces : *Origanum vulgare* **(Mockute *et al.,* 2001)**, *Mentha spicata* **(Edris *et al.,* 2003)**, *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* **(Bekhechi *et al.,* 2012)**. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

### I.2.2. Mécanisme de l'action antimicrobienne des huiles essentielles

#### I.2.2.1. Mode d'action antibactérien

Durant les dernières années, un intérêt accru s'est focalisé sur les substances biologiquement actives isolées des plantes, notamment en vue de l'élimination des micro-organismes pathogènes en raison de la résistance de ces derniers vis-à-vis des antibiotiques ou bien parce qu'il s'agit de composés écologiquement sains. Une très grande variété d'huiles essentielles est connue pour exercer des propriétés antimicrobiennes et, dans la plupart des cas, cette activité est due à la présence de constituants actifs représentés principalement par des monoterpènes, des sesquiterpènes, des alcools et autres hydrocarbures et phénols **(Goetz et Ghedira, 2012)**.

**-a- Sites d'action des huiles essentielles**

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé. Compte tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire **(El amri *et al.,* 2014)**. Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées dans la figure 13.

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane **(El amri *et al.,* 2014)**, en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie. Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides, provoquant ainsi la mort de la bactérie (**Fernandez et Chemat, 2012)**.

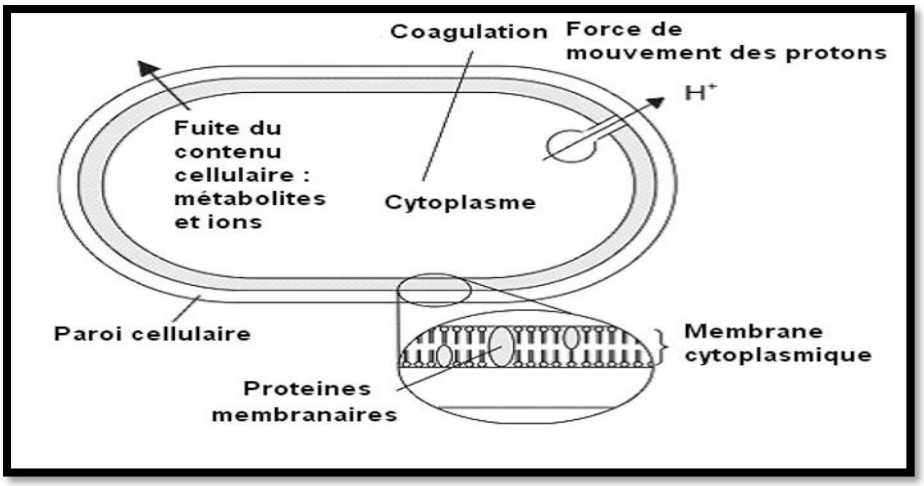



**Figure 13 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Goetz et Ghedira, 2012)**

**-b- Sites d'action de quelques composés des huiles essentielles**

L'activité biologique d'une HE est liée à sa composition chimique mais surtout à la nature des groupements fonctionnels des composés majoritaires **(Zhiri, 2006)**. Il faut aussi tenir compte de l'existence de synergie que nous développerons dans le paragraphe I.2.3.

Le carvacrol et le thymol semblent capables de libérer les lipo-polysaccharides et d'augmenter la perméabilité membranaire en détruisant la membrane externe des bactéries à Gram négatif **(Lambert et *al.*, 2001)**. Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *B. cereus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité passive. En outre, le carvacrol, agit comme un transporteur transmembranaire des cations et des protons monovalents, cet effet perturbe le gradient ionique et le fonctionnement membranaire des cellules microbiennes **(Ultee *et al.*, 2002)**. L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles **(Trombetta *et al.*, 2005)**. Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. Une étude, menée par **Walsh *et al.*** en **2003** a montré que la molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Echerichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium $K^+$. En revanche, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa.*

Le cinnamaldéhyde est le principal constituant de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*). Ce composé est très actif contre de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif (*Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus, Enterobacter sp.*). Il inhibe

les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire **(Gill et Holley, 2004 ; 2006)**. L'eugénol est le principal composant de l'huile essentielle de clou de girofle. Comme le carvacrol, il provoquerait une dégradation de la paroi cellulaire entraînant une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires **(Gill et Holley, 2006)**.

Les alcools agissent généralement en dénaturant les protéines, comme solvant ou comme agents de déshydratation, alors que les aldéhydes peuvent induire des réactions de transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques **(Goetz et Ghedira, 2012)**.

**I.2.2.2. Mode d'action antifongique**

Les huiles essentielles agissent sur la respiration de certaines levures **(Cox *et al.*, 2000)** et champignons filamenteux **(Inouye *et al.*, 1998)**. Elles peuvent inhiber les enzymes responsables de la régulation de l'énergie ou de la synthèse des composés structuraux **(Burt, 2004)**. L'observation sous microscope électronique des cellules fongiques du genre *Candida* montre leur altération ultra structurale, augmentation du nombre de vésicules et perturbation de la division cellulaire **(Nakamura *et al.*, 2004)**.

L'effet fongicide ou fongistatique des huiles essentielles sur les champignons filamenteux s'accompagne par des modifications morphologiques et une influence sur la morphogénèse hyphale **(Bourrel *et al.*, 1995)**. Les cibles principales des huiles essentielles sont la paroi et les membranes cellulaire et nucléaire. Ils causent par conséquent une réduction de la production des spores et des aflatoxines **(Rasooli et Owlia, 2005)**.

**I.2.3. Synergie et antagonisme entre les constituants des huiles essentielles**

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des composés chimiques isolés est qualitativement identique. Cependant, il existe des différences quantitatives. Certaines études ont montré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés en mélange ou séparément (**Lahlou, 2004)**, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité et qu'ils peuvent avoir un effet synergique ou amplificateur de l'activité. Les deux principaux constituants de structure voisine et présents dans les huiles essentielles d'origan, carvacrol et thymol, présentent un effet additif contre *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* **(Goetz et Ghedira, 2012)**.

Le précurseur biologique du carvacrol, le *p*-cymène, présente un caractère hydrophobe et provoque le gonflement de la membrane cytoplasmique dans une plus grande mesure que le carvacrol. Utilisé seul, le *p*-cymène ne présente pas d'activité antibactérienne significative, lorsqu'il est associé au carvacrol, on observe une synergie d'action des deux composés contre

*B. cereus in vitro*. Une plus grande efficacité du *p*-cymène est signalée lorsqu'il est incorporé dans la bicouche lipidique de *B. cereus*, facilitant vraisemblablement le transport du carvacrol à travers la membrane cytoplasmique **(Goetz et Ghedira, 2012)**.

**Dorman et Deans** en **2000** ont montré que l'ajout d'un groupement acétate à la molécule semble augmenter l'activité antibactérienne, l'acétate de géranyle est plus actif que le géraniol contre une gamme de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Le rôle fondamental du groupement hydroxyle dans l'action des phénols a également été confirmé par **Ultee *et al.*** en **2002**, et sa position relative sur le noyau benzénique influence peu le degré d'activité. La nature des groupements alkyles peut également influencer cette activité : les substituant alkényles sont plus actifs que les substituants alkyles. Ainsi, le limonène, qui est substitué par un groupement isopropylène en position 4, présente une plus forte activité que son homologue le *p*-cymène, substitué par un groupement isopropyle **(Dorman et Deans, 2000)**.

**I.2.4. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles**

Les vertus antimicrobiennes des HEs sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles **(Hala *et al.*, 2000)** et des applications sans bases scientifiques précises. On note l'étude faite par Chamberland en 1887 sur l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle **(Beylier-Maurel, 1976)** et qu'en **1919 Gattefossé** a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin. Par conséquent, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes **(Burt, 2004)**.

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des HEs des plantes aromatiques (**Flamini *et al.*, 1999 ; Marino *et al.*, 1999 ; Cox *et al.*, 2000 ; Dorman et Deans, 2000)**. Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre **(Kalemba et Kunicka, 2003)**.

La plupart des études développant l'action des HEs sur la détérioration des organismes et agents pathogènes concluent généralement que les HEs sont plus actives contre les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif **(Ouattara *et al.*, 1997 ; Smith-Palmer *et al.*, 1998 ; Negi *et al.*, 1999 ; Juliano *et al.*, 2000 ; Ruberto *et al.*, 2000 ; Lambert *et al.*, 2001 ; Smith-Palmer *et al.*, 2001 ; Cimanga *et al.*, 2002)**. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur

paroi cellulaire **(Burt, 2004)**. Il existe cependant quelques exceptions, les bactéries à Gram négatif telles que : *Aeromonas hydrophila, P. aeruginosa* **(Goetz et Ghedira, 2012)** et *Campylobacter jejuni* **(Wannissorn *et al*., 2005),** ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles.

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM) **(May *et al*., 2000 ; Tohidpour *et al*., 2010)** et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) **(Fisher et Phillips, 2009)**. Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae, Samonella typhimurium, Salmonella entereditis* et *S. aureus* **(Shin et Kim, 2005)**. Le mélange de différentes huiles essentielles comme l'origan et le thym, l'origan et la marjolaine, le thym et la sauge a aussi montré un fort pouvoir antibactérien contre *Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* O157:H7 et *Listeria monocytogenes* **(Gutierrez *et al*., 2008)**.

L'activité antimicrobienne est le résultat de groupes fonctionnels présents dans les métabolites et de leurs synergies. Les plus actifs de ces groupes fonctionnels sont les : phénols > aldéhydes > cétones > alcools > éthers > hydrocarbures **(Fernandez et Chemat, 2012)**. Cependant, plusieurs publications ont montré les activités antimicrobiennes de ces composés : linalol (**Changmann Yoon, 2011 ; Park *et al*., 2012 ; Huo *et al*., 2013 ; Miyashita et Sadzuka, 2013)**, *p*-cymène **(Akash Kedia, 2013 ; Chen *et al*., 2014)**, géraniol **(Chen et Viljoen, 2010)**, limonène **(Singh *et al*., 2010),** bornéol **(Tantaoui-Elaraki, 1993 ; Jaafari *et al*., 2007)**, thymol **(Riella *et al*., 2012 ; Wattanasatcha *et al*., 2012 ; Gavliakova et Biringerova, 2013)**, carvotanacétone (**Gherib *et al*., 2016)**, citronellal **(Singh *et al*., 2012 ; Sadaka *et al*., 2013),** périllaldéhyde **(Kim *et al*., 1995 ; El-Haci *et al*., 2014 ; Tian *et al*., 2015)** et cinnamaldéhyde **(Ye *et al*., 2013)**.

D'autres études ont montré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides par exemple : l'effet bactéricide du carvacrol sur *Bacillus cereus* dans les aliments **(Ultee *et al*., 1998 ; 2000)**, l'effet inhibiteur du thymol et du carvacrol, composés majoritaires des huiles essentielles de thym et d'origan contre *E. coli, Salmonella enteritidis, S. choleraesuis* et *S. typhimurium* **(Burt, 2004)** et l'effet de ces deux composés, utilisé individuellement ou en combinaison sur des germes d'infection respiratoire **(Didry, 1993)**. Enfin, **Juven *et al*. (1994)** ont obtenu une diminution importante des cellules

vivantes de *S. thyphimurium* en les traitant par l'huile de thym et ses constituants actifs. Le thymol ainsi que l'eugénol sont responsables de l'activité bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent **(Goetz et Ghedira, 2012 ; Santoyo *et al.*, 2006)**.

Le pouvoir antifongique des HEs des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes **(De Billerbeck *et al.*, 2002 ; Koba *et al.*, 2004 ; Oussou *et al.*, 2004 ; Ouraini *et al.*, 2005)** et contre les dermaphytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (**Teixeira-Duarte *et al.*, 2005)**. D'autre études ont démontré que les HEs de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus* **(Omidbeygi *et al.*, 2007)**. Les HEs d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camaldulensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* **(Jaset-Dongmo *et al.*, 2008)**. L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* **(Barel *et al.*, 1991)**, *A. setacea*, *A. teretifolia* **(Unlu *et al.*, 2002),** *A. millefolium* **(Candan *et al.*, 2003)**, contre la levure pathogène *Candida albicans*, et *Achillea odorata* L. subsp. *pectinata* (Lamk) var. *microphylla* (Willd.) Willk. **(Bekhechi *et al.*, 2011)** contre plusieurs champignons filamenteux a également été mise en évidence. Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé **(Burt, 2004)** ont été décrites.

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des HEs telles que les monoterpénols et les monoterpénals. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des HEs ont montrées des améliorations importantes **(Siddiqui *et al.*, 1996 ; Schnitzler *et al.*, 2001 ; Schuhmacher et Reichling, 2003)**. L'HE de *Melissa officinalis* qui contient le citral et le citronellal empêche la réplication du virus d'herpès simplex (HSV-2) **(Allahverdiyev *et al.*, 2004)**. L'HE de scléranthe possède l'activité la plus efficace contre HSV-1 et inhibe complètement la réplication virale après une incubation de 24 heures, même à une concentration de 0,1%. Les huiles essentielles d'*Eucalyptus*, de *Santolina insularis*, et de l'arbre à thé australien ont montré aussi des effets antiviraux contre HSV-1 **(Armaka *et al.*, 1999)**. Aussi, le virus Junin, responsable de la fièvre hémorragique s'est montré très sensible aux huiles essentielles de *Lippia junelliana* et de *L. turbinata* **(Garcia *et al.*, 2003)**.

## II. Propriétés antioxydantes des huiles essentielles

### II.1. Les antioxydants et le stress oxydatif

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et des espèces réactives

de l'oxygène (EROs). En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EROs. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant et les antioxydants **(Haleng *et al.*, 2007).**

Le stress oxydatif est provoqué par un déséquilibre entre les espèces réactives et les antioxydants. Les principaux radicaux libres, y compris l'hydroxyle, le superoxyde et l'oxyde nitrique, sont considérés comme des dérivés réactifs de l'oxygène (DROs). Les antioxydants sont des régulateurs de la production des DROs et préviennent les effets délétères, incluant le stress oxydatif **(Cao et Prior 1998 ; Koelichlin-Ramonatxo, 2006 ; Defraigne et Pincemail, 2008 ; Uttara *et al.*, 2009).**

Pour se protéger des effets nocifs des EROs, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses : l'un est exogène (vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque) ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase SOD ; glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) **(Pincemail *et al.*, 2002)**.

Par ailleurs, les industriels utilisent des antioxydants synthétiques, tels que le BHA (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), le BHT (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), le TBHQ (tertiobutyl-hydroquinone), et le PG (gallate de propyle) dans l'industrie alimentaire. Ils constituent des moyens faciles et économiques afin de remédier aux évolutions oxydatives, principale cause de dégradation **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

Cependant l'utilisation de ces antioxydants synthétiques est suspectée d'entraîner à long terme des effets tératogènes, mutagènes et cancérogènes. D'importants travaux de recherche ont conduit l'industrie alimentaire à envisager l'incorporation de substances considérés comme non chimiques au sein de leur préparation. Dans ce contexte, les huiles essentielles contiennent une source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet de nombreuses études concernant leurs éventuelles utilisations en tant qu'antioxydants en agroalimentaire ou en cosmétique. Les tocophérols, naturellement présents dans les huiles végétales, notamment l'α-tocophérol, sont très utilisés en cosmétique **(Fernandez et Chemat, 2012)**. Leur caractère hydrophobe leur permet de réagir avec les radicaux peroxyles (ROO•) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique **(Haleng *et al.*, 2007)**.

En plus de la vitamine E, la vitamine C est un excellent piégeur des EROs (HO• ou O•). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques **(Haleng *et al.*, 2007)**.

**II.2. Les activités antioxydantes des huiles essentielles**

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Parmi ces travaux, les huiles essentielles des *Citrus* sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes dont le limonène est le constituant majeur, jouant un rôle principal dans l'activité antioxydante **(Hyang-Sook *et al.*, 2000 ; Girennavar *et al.*, 2007 ; Ao *et al.*, 2008 ; Buchbauer, 2010)**. Les huiles essentielles de cannelle, muscade, piment, laurier, clou de girofle, basilic, persil, origan, coriandre, eucalyptus, genévrier, cumin et de thym présentent également un pouvoir antioxydant **(Billot et Wells, 1975 ; Mantle *et al.*, 1998 ; Tomaino *et al.*, 2005 ; Karioti *et al.*, 2006 ; Politeo *et al.*, 2006 ; Edris, 2007 ; El-Ghorab *et al.*, 2008 ; Miguel, 2010 ; Saleh *et al.*, 2010 ; Amorati *et al.*, 2013)**. L'huile essentielle de thym a montré le plus grand effet antioxydant parmi 25 HEs testées, suivie de celle de clou de girofle, de cannelle, de basilic, d'eucalyptus et de camomille **(Wei et Shibamoto, 2010)**.

**III. Propriétés anti-inflammatoires des huiles essentielles**

Les HEs sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite **(Maruyama et *al.*, 2005)**. Plusieurs études ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire des HEs **(Siani *et al.*, 1999 ; Koh *et al.*, 2002 ; Silva *et al.*, 2003 ; Caldefie-Chézet *et al.*, 2004 ; 2006 ; Dordevic *et al.*, 2007 ; Lin *et al.*, 2008 ; Olufunke *et al.*, 2009 ; Cabral *et al.*, 2015)** et de ses composés principaux, l'α-terpinéol **(Hart *et al.*, 2000)** et le salicylate de méthyle **(Belanger *et al.*, 1994)**. L'*Aloe vera* est une des plantes les plus connues pour son activité anti-inflammatoire **(Vogler et Ernst, 1999)**. En effet, une amélioration de la cicatrisation a été observée par l'utilisation de l'aloès chez les rats diabétiques **(Chithra *et al.*, 1998)** et dans divers cas de l'ischémie cutanée **(Heggers *et al.*, 1993)**.

Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'ail ou le curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer **(Jafri *et al.*, 2001 ; Béliveau *et al.*, 2005)**. Certains de ces aliments contiennent des composés volatils dont l'activité chimio-préventive a été mise en évidence. L'huile essentielle d'ail constitue, par exemple, une source de composés sulfurés **(Pyun *et al.*, 2006)** reconnus pour leur effet préventif contre le cancer **(Milner, 2001 ; 2006)**.

# Deuxième partie

## Partie expérimentale

***« Ce que voient les yeux n'est pas le remède ; lorsque la distillation aura transformé le végétal, alors le remède deviendra manifeste »***

**Paracelse** (1493 – 1541)

Depuis les temps les plus anciens, les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles.

Actuellement, cette médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt notable, et, c'est grâce aux études scientifiques basées sur les méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales.

Pour le présent travail, nous nous sommes proposés de valoriser une espèce végétale, à savoir : *Tetraclinis articulata* (thuya), qui pousse spontanément dans la région de Tlemcen. Cette plante est une Cupressacées quasiment endémique de l'Afrique du nord, elle est essentiellement centrée sur le Maghreb.

Dans cette partie expérimentale, nous présenterons les techniques utilisées dans cette étude :

- ✓ Extraction des huiles essentielles des parties aériennes et des cônes de *Tetraclinis articulata* par hydrodistillation ;
- ✓ Caractérisation des huiles essentielles de cette plante. Les analyses ont été réalisées dans le laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'université de Corse, par une application conjointe de plusieurs méthodes chromatographiques et spectroscopiques ;
- ✓ Etude des activités biologiques (antimicrobienne et antioxydante) des huiles essentielle de cette espèce végétale.

## I. Matériel végétal et extraction des huiles essentielles

### I.1. Matériel végétal

La récolte des plantes a été effectuée dans huit stations de la région de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie). Les prélèvements ont été réalisés sur des pieds individuels adultes.

Cinquante échantillons des parties aériennes (feuilles et fleurs) ont été récoltés en pleine floraison, en mars 2014. Les prélèvements ont été réalisés comme suit (**Tableau 1, Figure14**) : Zone littorale [Honaïne (échantillons H1-H4), Beni Khellad (échantillons BK17-BK22), Souk Tlata (échantillons ST23-ST28), Ghazaouet (échantillons G29-G35)] ; Zone montagneuse [Sebdou (échantillons S5-S10), Ouled Mimoun (échantillons OM11-OM16), Aïn Kebira (échantillons AK36-AK42) et Sabra (échantillons Sab43-Sab50)]. Parallèlement, nous avons réalisé des récoltes des parties aériennes sur le même pied au cours d'une année (de mars 2014 à février 2015) dans la région d'Aïn Kebira (échantillon **AK37**).

Quarante échantillons des cônes ont été prélevés en mois de septembre 2014 dans les mêmes stations cités précédemment : Zone littorale [Souk Tlata (échantillons ST1-ST5), Honaïne (échantillons H16-H20), Beni Khellad (échantillons BK31-BK35), Ghazaouet (échantillons G36-G40)] ; Zone montagneuse [Sabra (échantillons Sab6-Sab10) ; Aïn Kebira (échantillons AK11-AK15) ; Ouled Mimoun (échantillons OM21-OM25) et Sebdou (échantillons S26-S30)].

Cette espèce végétale a été identifiée par le Professeur Bouazza M. (Laboratoire d'Écologie et Gestion des Écosystèmes, Université de Tlemcen). Un spécimen a été déposé au niveau du laboratoire des « Produits Naturels » (Département de Biologie, Université de Tlemcen), sous le numéro de référence C. 46.

**Tableau 1 : Lieux des prélèvements du thuya, situation géographique et bioclimat des différentes stations d'étude**

| Stations | Etages bioclimatiques | Altitude (m) | Latitude (Nord) | Longitude (Ouest) |
|---|---|---|---|---|
| **Ghazaouet** | Chaud et tempéré | 42 | 35°08' | 1°85' |
| **Honaïne** | Chaud et tempéré | 165 | 35°49' | 1°00' |
| **Beni Khellad** | Chaud et tempéré | 408 | 35°06' | 1°71' |
| **Sabra** | Chaud et tempéré | 495 | 34°80' | 1°62' |
| **Souk Tlata** | Chaud et tempéré | 497 | 35°02' | 2°01' |
| **Ouled Mimoun** | Chaud et tempéré | 768 | 34°90' | 0°98' |
| **Aïn Kebira** | Chaud et tempéré | 779 | 35°02' | 1°67' |
| **Sebdou** | Chaud et tempéré | 1210 | 34°64' | 1°02' |

### I.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée au laboratoire par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, pendant une durée de 2h30. Les rendements en huiles essentielles sont calculés par le rapport entre la masse d'huile essentielle et la masse végétale sèche à traiter **(Carré, 1953)**. Pour éviter leur dégradation, due à l'action de l'air ou de la lumière, nous avons conservé les huiles essentielles à 4 ± 1° C dans l'obscurité.

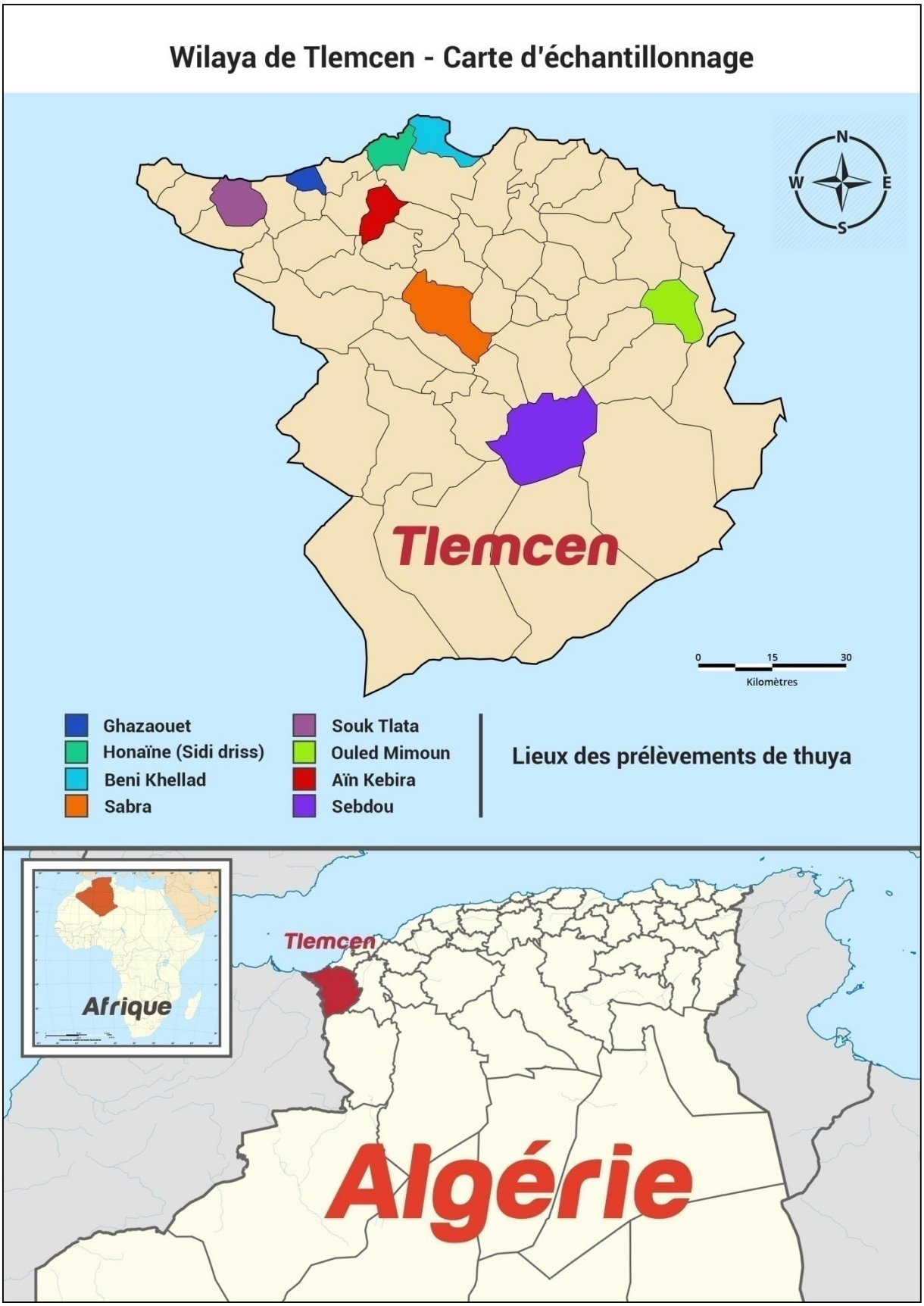



**Figure 14 : Situation géographique des lieux des prélèvements de *Tetraclinis articulata***

## II. Analyse des huiles essentielles

Les analyses de tous les échantillons d'huile essentielle par CPG-Ir, CPG-SM et RMN $^{13}C$ ont été effectuées au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse-CNRS.

### II.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

- **Conditions opératoires**

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer type Clarus 500, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur diviseur et de deux colonnes capillaires de dimensions (50 m x 0,22 mm ; épaisseur du film : 0,25 µm), apolaire (BP-1, polyméthylsiloxane) et polaire (BP-20, polyéthylène glycol).

Le gaz vecteur est l'hélium (0,8 mL/min), avec une pression en tête de colonne de 25 psi ; la température de l'injecteur et du détecteur est de 250°C ; la température est programmée depuis 60°C jusqu'à 220°C, à raison de 2°C/min, suivie d'un palier de 20 min à 220°C ; l'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/60. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,1 µL.

- **Identification des constituants**

Les constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (Ir) calculés par rapport à une série d'alcanes ($C_8$-$C_{28}$) avec interpolation linéaire sur les deux colonnes, avec ceux des composés de référence contenus dans la bibliothèque du laboratoire.

### II.2. Spectrométrie de Masse (SM)

Les huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), réalisée au laboratoire de « Chimie des Produits Naturels » et au laboratoire de « Chimie et Biomasse », respectivement de l'université de Corse.

- **Conditions opératoires**

➢ **Parties aériennes (feuilles et fleurs)**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue (60m x 0,22 mm, épaisseur du film 0,25 µm), Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane), couplé à un détecteur de masse Perkin-Elmer TurboMass. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source d'ionisation

est de 150°C. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

Le gaz vecteur est l'hélium (1 mL/min), exerçant une pression en tête de colonne de 43 psi ; la température linéaire est programmée depuis 60°C jusqu'à 230°C, à raison de2°C/min, suivie d'un palier de 45 min à 230°C ; l'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µL.

- **Cônes**

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer TurboMass doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue (50 m x 0,22 mm, épaisseur du film 0,25 µm), BP-1 (diméthylpolysiloxane), couplé à un détecteur de masse Perkin-Elmer TurboMASS. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 250°C. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 40-400 Da.

Le gaz vecteur est l'hélium (0,8 mL/min), exerçant une pression en tête de colonne de 43 psi ; la température linéaire est programmée depuis 60°C jusqu'à 220°C, à raison de 2°C/min, suivie d'un palier de 20 min à 220°C ; l'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/60. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,5 µL.

**II.3. Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 (RMN $^{13}$C)**

La RMN du $^{13}$C est utilisée selon la méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse **(Tomi *et al.*, 1995)**, qui est basée sur la comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des produits de référence enregistrés dans des conditions expérimentales (solvant, dilution) rigoureusement identiques à celles des huiles essentielles et stockés dans des bibliothèques de spectres propres au laboratoire.

- **Conditions opératoires**

Les spectres RMN ont été enregistrés avec une sonde de 5 mm dans le chloroforme deutéré ($CDCl_3$) additionné de tétraméthylsilane (TMS) sur un spectromètre de marque « Bruker AVANCE 400 », opérant à 100,623 MHz pour le carbone 13 sous les conditions opératoires suivantes : angle d'impulsion 45° ; temps d'acquisition de 2,73 s correspondant à acquisition de 128 K avec une largeur spectrale (SW) de 220 000 Hz (220 ppm) ; résolution digitale de 0,183 Hz/pt. Le nombre d'accumulation est compris entre 2 000 et 3 000 pour chaque enregistrement.

Les spectres RMN des échantillons de *Tetraclinis articulata* ont été enregistrés en dissolvant 40 mg d'huile essentielle dans 0,5 mL de $CDCl_3$. Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la transformée de Fourrier par une fonction exponentielle (LB = 1,0 Hz). Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne.

- **Identification des constituants**

L'identification est réalisée par la prise en compte de trois paramètres / i) le nombre de pics observés par rapport à ceux attendus pour chaque molécule, ii) le nombre de superpositions des signaux et iii) les variations des déplacements chimiques des carbones dans les spectres du mélange par rapport aux valeurs de référence (Δδ). En plus de ces paramètres qui sont directement accessibles par un logiciel élaboré au laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'université de Corse **(Tomi *et al.*, 1995 ; Rezzi *et al.*, 2002 ; Tomi et Casanova, 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009)**, l'intensité des raies de résonance permet de contrôler l'appartenance d'un déplacement chimique à un composé donné. Cette technique permet l'identification de différents composants à une teneur supérieure ou égale à 0,3-0,4% sans purification préalable.

### II.4. Analyse statistique

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée à l'aide du logiciel *XL*STAT-PRO (Addinsoft, France).

## III. Etude des activités biologiques des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*

La phytothérapie n'a pas attendu les découvertes scientifiques pour exploiter les vertus des plantes. En effet, les HEs obtenus à partir de matières végétales constituent une source de molécules naturelles bioactives. Son utilisation s'est développée depuis une quarantaine d'années et les HEs sont actuellement considérées comme des alternatives potentielles aux antibiotiques pour traiter diverses maladies infectieuses, et aux agents chimiques de conservation des denrées alimentaires et des produits cosmétiques **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier le pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata.*

Pour les huiles essentielles des parties aériennes, nous avons mélangé les échantillons appartenant au même chémotype pour disposer d'une quantité suffisante afin de pouvoir réaliser les activités biologiques.

### III.1. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes de *Tetraclinis articulata*

Nous avons déterminé le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de thuya (3 types chimiques différents: huile essentielle à α-pinène, à camphre et à acétate de bornyle) vis-à-vis de six bactéries, deux levures et deux champignons filamenteux en appliquant la méthode de diffusion sur disque. Dans le cas de réponse positive, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) en utilisant la méthode de contact direct en milieu gélosé.

#### III.1.1. Provenance des germes

Les souches pathogènes (**Tableau 2**) utilisées ont été choisis pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires, leurs résistance courante à différents antibiotiques et pour leurs pathogénicités.

**Tableau 2 : Origines des souches utilisées pour l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles**

| | Microorganismes | Gram | Code | Origine |
|---|---|---|---|---|
| ***Bactéries*** | *Pseudomonas aeruginosa* | | ATCC 27853 | **LAPRONA** |
| | *Escherichia coli* | **Négatif** | ATCC 8739 | **LAPRONA** |
| | *Klebsiellapneumoniae* | | ATCC 700603 | **MNHN** |
| | *Enterococcusfaecalis* | | ATCC 13047 | **LAPRONA** |
| | *Staphylococcus aureus* | **Positif** | ATCC 6538 | **MNHN** |
| | *Staphylococcus aureus* | | ATCC 25923 | **LAPRONA** |
| ***Levures*** | *Candida albicans* | | CIP 444 | **LAPSAB** |
| | *Candida albicans* | | ATCC 10231 | **LAPRONA** |
| ***Champignons*** | *Aspergillus flavus* | | MNHN 994294 | **MNHN** |
| | *Aspergillus fumigatus* | | MNHN 566 | **MNHN** |

***MNHN :*** Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) ; ***LAPRONA :*** Laboratoire des Produits Naturels (Université de Tlemcen) ; ***LAPSAB :*** Laboratoire antibiotiques antifongiques, physicochimie synthèse et activité biologique.

#### III.1.2. Mise en culture des souches

Une préculture des souches microbiennes est préparée afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance. La turbidité est ensuite ajustée avec un spectrophotomètre, à 1-2 × $10^8$ UFC/mL pour les bactéries (DO = 0,08 à 0,1 / λ = 625 nm) et 1-5 × $10^6$ UFC/mL pour

les levures (DO = 0,12 à 0,15 / λ = 530 nm) **(NCCLS, 2001)**. Pour les moisissures, les suspensions (préparées à partir d'une culture de 7 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) sont ajustées à $10^6$ spores/mL, ce qui correspond à une transmittance de 68-82% (λ = 530 nm) **(Pfaller *et al*., 1998)**.

**III.1.3. Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles**

Le choix des techniques utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles a une grande influence sur les résultats, l'insolubilité des constituants des HEs dans l'eau et leur volatilité constituent les principales difficultés rencontrées. Les techniques classiques mises au point *in vitro* permettent soit i) de caractériser le pouvoir antimicrobien ii) de le quantifier en termes de concentration minimale inhibitrice ou de concentration minimale microbicide (bactéricide). Ces méthodes sont appliquées en milieu solide ou en milieu liquide **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

Dans un premier temps, nous avons testé les huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) vis-à-vis des souches microbiennes par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale (CMI) en milieu solide.

**III.1.3.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)**

Cette méthode est reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies. Il s'agit d'une méthode qualitative permettant de tester la sensibilité ou la résistance des microorganismes aux HEs par contact direct.

Pour effectuer ce test, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 15 µL d'huile essentielle et de 5 µL de DMSO sont déposés à la surface d'un milieu gélosé en boîte de pétri (3 disques par boîte), préalablement ensemencées en surface en nappe avec 1 mL de suspension microbienne ($10^6$ UFC/mL pour les levures et les souches bactériennes sauf *S. aureus* qui a été ensemencée à $10^7$ UFC/mL et $10^4$ spores/mL pour les moisissures) pendant 10 à 15 min. L'excédant de l'inoculum est éliminé par aspiration.

Les milieux de culture utilisées sont : i) la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries, ii) le Sabouraud dextrose pour les levures et iii) le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour les moisissures.

Les boîtes sont laissées 1 h à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18-24 h pour les bactéries, à 30°C pendant 24-48 h pour les levures et à 25°C pendant 3 à 4 jours pour les moisissures. Pendant l'incubation, les germes se développent sous forme

de colonies visibles à l'œil nu. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du développement microbien. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré (mm), disque inclus.

En parallèle, la sensibilité des souches microbiennes, vis-à-vis de : la nystatine (Ny. 30 µg/disque), le fluconazole (FLU. 25µg/disque), la pénicilline (PEN. 6µg/disque), l'Amoxicilline (AM. 10 µg/disque), l'Oxacilline (OX. 5 µg/disque), la ciprofloxacine (CIP. 10 µg/disque), la vancomycine (VA. 30µg/disque), a été testée comme contrôle positif et du DMSO (20 µL/disque) comme contrôle négatif.

**III.1.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé**

En bactériologie médicale, chaque souche est caractérisée en termes de résistance ou de sensibilité aux antibiotiques au moyen de deux valeurs : le diamètre d'inhibition et la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique ou d'extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne. Fréquemment, la CMI n'est pas bactéricide, les cellules d'inoculum sont capables de se développer après repiquage sur milieu exempt du composé inhibiteur. La CMI est la plus faible concentration requise pour l'inhibition complète de l'organisme test en 24 ou 48 heures d'incubation **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

Pour déterminer les CMIs des huiles essentielles vis-à-vis des souches sensibles, nous avons utilisé la méthode de contact direct en milieu gélosé. Les huiles essentielles sont déposées dans les boîtes de pétri afin d'effectuer une gamme de concentration de 0,125 à 2µL/mL dans le milieu PDA, pour les champignons filamenteux et de 2 à 6 µL/mL dans la gélose Mueller-Hinton pour les bactéries, avec pour chaque concentration, son équivalent en DMSO. Le mélange est alors homogénéisé et ensuite refroidi. Après une duré d'incubation de 24 h à 37°C pour les bactéries, et de 3 à 4 jours à 25°C pour les mycètes, la lecture des résultats se fait par la présence ou l'absence de la croissance microbienne.

**III.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes et des cônes de *Tetraclinis articulata***

Dans cette partie, nous avons déterminé le pouvoir antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) (3 types chimiques : huile essentielle à α-pinène, à camphre et à acétate de bornyle) et des cônes de thuya (12 échantillons), choisis en fonction de leur profil chromatographique. Les douze échantillons d'huile essentielle sont les suivants :

- **Echantillon du groupe I :** trois échantillons de la station d'Aïn Kebira (E2 AK, E3 AK, E4 AK) et un échantillon de la station d'Ouled Mimoun (E2 OM).

- **Echantillon du sous-groupe IIA :** deux échantillons de la station de Ghazaouet (E1 G et E5 G), un échantillon de la station de Honaine (E3 H) et un autre échantillon de la station d'Ouled Mimoun (E4 OM).
- **Echantillon du sous-groupe IIB :** deux échantillons de la station de Ghazaouet (E3 G et E4 G), et deux échantillons de la station de Sabra (E1 Sab et E4 Sab).

**III.2.1. Méthodes d'étude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles**

Même si les antioxydants de synthèse sont efficaces et bon marché et que leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité, on a assisté depuis les années 1980 à un engouement pour les produits naturels, et au développement d'extraits végétaux à usage antioxydant, qui auraient des propriétés biologiques pouvant contribuer à réduire le risque de certaines pathologies **(De-Reynal et Multon, 2009)**.

Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois tests chimiques, à savoir : le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le blanchissement du *β*-carotène et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP). Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

**III.2.1.1. Piégeage du radical libre DPPH•(2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)**

Le DPPH est un radical stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm **(Bandoniene *et al.*, 2002 ; Pavlov *et al.*, 2002 ; Gazi *et al.*,2004)**.

Ce test permet de mesurer la capacité réductrice d'un antioxydant en présence d'un radical libre, le DPPH•. C'est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette (**Figure 15**). La forme réduite (jaune pâle) n'absorbe plus, ce qui se traduit par diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.

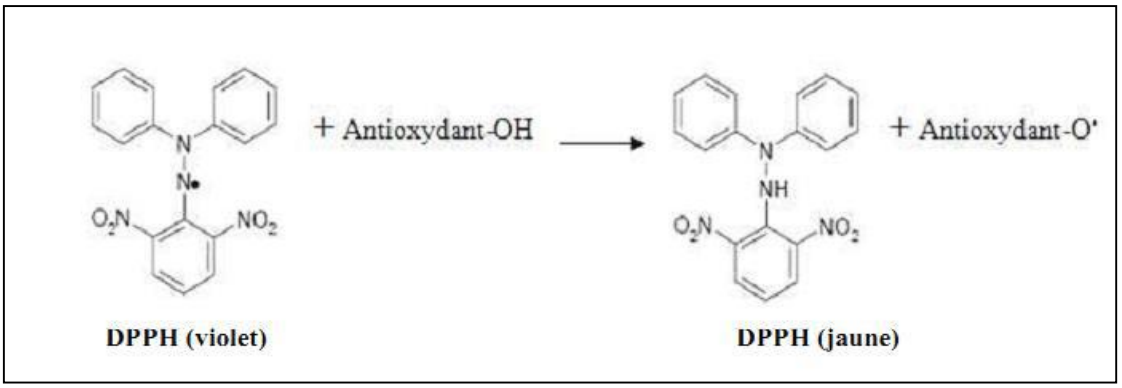



**Figure 15 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH**

L'effet des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* sur le (DPPH•**)** est mesuré par le protocole expérimental de **Benhammou *et al*. (2007)**. 50 µL de chaque échantillon (800 mg/mL) sont ajoutés à 1,95 mL d'une solution méthanolique de DPPH• (0,025 g/L) fraîchement préparée. Pour chaque concentration un blanc est préparé. Un contrôle négatif est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µL du méthanol avec 1,95 mL de la solution méthanolique de DPPH•**.** Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- Calcul des pourcentages d'inhibition

Nous avons calculé les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$\textbf{\% Inhibition} = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

$A_C$: Absorbance du contrôle

$A_T$: Absorbance du test effectué

- Calcul des $CI_{50}$

$CI_{50}$ ou concentration inhibitrice de 50% est la concentration de l'échantillon testée nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH•.

**III.2.1.2. Activité antioxydante par le test de blanchissement du *β*-carotène *(β-carotene bleaching method)***

Ce test est basé sur l'oxydation couplée du *β*-carotène et de l'acide linoléique solubilisé dans le Tween 40. Il consiste à mesurer la décoloration du *β*-carotène résultant de son oxydation par les radicaux peroxyles issus de l'acide linoléique. L'addition d'un antioxydant dans ce système retarde la décoloration du *β*-carotène. Ce test permet de déterminer un pourcentage d'inhibition **(Fernandez et Chemat, 2012)**.

Le protocole expérimental suivi est celui d'**Ozsoy *et al.* (2008)**.

Pour préparer l'émulsion du *β*-caroténe, 2 mg de ce dernier sont dissouts dans 10 mL de chloroforme, puis 1 mL de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique purifié et

200 mg du tween 40. Ensuite, le chloroforme est évaporé sous pression réduite par un évaporateur rotatif à 40°C et le résidu obtenu est repris par 50 mL d'eau ultra pure oxygénée. Des tubes contenant 5 mL de cette émulsion sont préparés, pour lesquels, 200 µL d'échantillons ou d'antioxydant de référence (BHA) à différentes concentrations sont ajoutés.

Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à $t_0$ contre un blanc qui contient l'émulsion sans *β*-caroténe. Les tubes fermés sont incubés à 50°C et la lecture de l'absorbance est effectuée après 120 min.

Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 mL de l'émulsion du *β*-carotène et 200 µL d'éthanol.

Les résultats obtenus sont exprimés en termes de pourcentage d'inhibition de la décoloration du *β*-carotène en employant la formule suivante :

$$\textbf{\% Inhibition} = [1-(A_0-A_t / A^0_0-A^0_t)] \times 100$$

$A_0$:Absorbance de l'échantillon à $t_0$

$A_t$: Absorbance de l'échantillon après incubation de 120 min

$A^0_0$:Absorbance du contrôle négatif à $t_0$

$A^0_t$ : Absorbance du contrôle négatif après incubation de 120 min

**III.2.1.3. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité de l'extraits testés à réduire le fer ferrique ($Fe^{3+}$) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux ($Fe^{2+}$). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminé à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés **(Hubert, 2006)**.

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. 1 mL de l'échantillon à différentes concentrations (1,562 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1 %. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3 000 rpm pendant 10 min. 2,5 mL du surnageant sont ajoutés à 2,5 mL d'eau distillée et 500 µL d'une solution de chlorure du fer ($FeCl_3$, $6H_2O$) à 0,1% sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

# Troisième partie

## Résultats et Discussion

***« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte »***

**Louis Pasteur** (1822-1895)

Le thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) est une Cupressacée quasiment endémique de l'Afrique du Nord. Cette espèce végétale est essentiellement centrée sur le Maghreb. En Algérie, elle est assez largement présente en Oranie littorale. A notre connaissance, la composition chimique des huiles essentielles des cônes a fait l'objet de trois publications. Ces huiles essentielles présentent différentes compositions en fonction du lieu de récolte. Un échantillon d'huile des cônes originaire de Malte contient principalement l'α-pinène et le limonène **(Buhagiar *et al.,* 2000)**. L'huile essentielle des cônes provenant de Tunisie renferme plusieurs composés présents en quantités appréciables : *p*-cymèn-8-ol, *trans*-pinocarvéol, acétate de fenchyle et carvone **(Tékaya-Karoui *et al.,* 2007)**. Deux échantillons d'huiles essentielles des cônes de *T. articulata* originaire d'Algérie ont été étudiés, récoltés à Hammam Melouane (40 km au sud d'Alger) et à Tipaza (70 km à l'ouest d'Alger). Ils se caractérisent par une forte teneur en α-pinène, suivi du limonène **(Chikhoune *et al.,* 2013)**.Ces deux échantillons présentent une similitude avec l'huile essentielle des cônes provenant de Malte, mais, en revanche, ils différent radicalement de l'huile essentielle des cônes originaire de Tunisie.

La composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de thuya, par contre, a fait l'objet de plusieurs études. Tous les échantillons d'huile étudiés renferment des monoterpènes comme composants principaux. Cependant, plusieurs compositions sont décrites avec une variation quantitative de trois constituants majoritaires : l'α-pinène, le camphre et l'acétate de bornyle **(Bourkhiss *et al.,* 2007b ; Barrero *et al.,* 2005 ; Bourkhiss *et al.,* 2007c ; Achak *et al.,* 2009 ; Ben Jemia *et al.,* 2012 ; Sliti *et al.,* 2016)**. Un échantillon d'huile essentielle des aiguilles du thuya du Canada contient également le 3-carène et le β-myrcène parmi les principaux constituants **(Kiliç, 2014)**. Un autre échantillon d'huile essentielle originaire de Tunisie renferme une teneur élevée en acétate de linalyle à côté de l'α-pinène **(Herzi *et al.,* 2013)**.

Concernant *T. articulata* poussant spontanément en Algérie, la composition de quelques échantillons d'huile essentielle a été étudiée. En général, ces échantillons sont dominées par les associations comprenant l'acétate de bornyle : acétate de bornyle/α-pinène, acétate de bornyle/α-pinène/camphre ou encore acétate de bornyle/camphre **(Chikhoune *et al.,* 2013 ; Djouahri *et al.,* 2013a ; Djouahri *et al.,* 2015 ; Larabi *et al.,* 2015)**, avec parfois du bornéol **(Benali Toumi *et al.,* 2011; Larabi *et al.,* 2015)**. Les huiles essentielles des feuilles de *T. articulata* récoltées dans la région de Tlemcen (ouest de l'Algérie) présentent des compositions similaires. L'huile essentielle des feuilles collectées à Ghazaouet contient une teneur élevée en acétate de bornyle, une très faible quantité en camphre et l'absence totale

de l'α-pinène **(Abi-Ayad *et al.*, 2013)**. Le camphre et l'acétate de bornyle sont les composés majoritaires d'un échantillon de provenance d'Ouled Mimoun, accompagné de bornéol **(Benali Toumi *et al.*, 2011)**. En revanche, un autre échantillon des parties aériennes récoltées à Oujlida est dominé par l'α-pinène, suivi par le cédrol et le δ-3-carène. L'acétate de bornyle est présent en faible quantité et le camphre est totalement absent **(Bouayad Alam *et al.*, 2014)**.

En règle générale, ces études concernent seulement un échantillon voire deux échantillons par pays et en conséquence, la composition déterminée n'est pas forcément représentative de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* du pays mentionné. En effet, à ce jour aucune étude n'a été mise en œuvre sur la variabilité chimique de l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata* dans une région déterminée.

Aussi, le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de cette espèce végétale à travers i) la détermination de la composition chimique, ii) l'étude de la variabilité chimique et iii) l'étude des activités biologiques.

## I. Caractérisation chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*

Compte tenu de ces observations, nous nous sommes proposés de caractériser *Tetraclinis articulata* poussant spontanément dans la région de Tlemcen à travers la composition chimique des huiles essentielles des cônes et des parties aériennes (feuilles et fleurs). En exploitant la complémentarité des techniques analytiques (CC, CPG(Ir), CPG-SM et RMN $^{13}C$), nous détaillerons l'analyse d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs), ainsi qu'une étude globale sur 50 échantillons.

Nous présenterons ensuite l'étude de la variabilité chimique de l'huile essentielle de 40 échantillons de cônes de cette même espèce végétale en utilisant la même stratégie analytique.

### I.1. Etude de la composition et de la variabilité chimique des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*

Dans le but de mettre en évidence une homogénéité ou une éventuelle variabilité chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*, nous avons étudié la composition chimique de 50 échantillons. Les prélèvements ont été réalisés en mars 2014, en pleine floraison dans huit stations de la région de Tlemcen:

- Zone littorale [Honaïne (échantillons H1-H4), Beni Khellad (échantillons BK17-BK22), Souk Tlata (échantillons ST23-ST28), Ghazaouet (échantillons G29-G35)] ;

- Zone montagneuse [Sebdou (échantillons S5-S10), Ouled Mimoun (échantillons OM11-OM16), Aïn Kebira (échantillons AK36-AK42) et Sabra (échantillons Sab43-Sab50)].

Parallèlement, nous avons étudié la composition chimique des huiles essentielles au cours d'une année. Pour cela, la récolte a été réalisée chaque mois depuis mars 2014 jusqu'à février 2015 sur un seul pied dans la station d'Aïn Kebira (échantillon AK37).

**I.1.1. Rendements d'extraction**

Les huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* ont été obtenues par l'hydro-distillation des parties aériennes (feuilles et fleurs) broyées. Elles sont d'aspect liquide et de couleur jaune pâle. Les rendements sont calculés par rapport à la matière végétale sèche et reportés dans le tableau (3).

Les teneurs en huile essentielle sont très variables, variant entre 0,03 à 0,86%. Ces variations concernent également la même station comme par exemple la station de Ghazaouet où les rendements varient entre 0,04 et 0,75% (**Tableau 3**). Par contre, nous n'avons constaté aucune corrélation directe entre le rendement en huile essentielle et l'altitude. En effet, les valeurs moyennes des rendements semblables (environ 0,30%) ont été calculées pour Ghazaouet (42 m), Souk Tlata (497 m) et Aïn Kebira (779 m). Les rendements les plus importants ont été obtenus pour Honaïne (165 m, 0,42%) et Beni Khellad (408 m, 0,51%). En revanche, deux stations situées à la même altitude (Sabra, 495 m et Souk Tlata, 497 m) fournissent des valeurs de rendements très différents (0,13% et 0,31%, respectivement). Par contre, les rendements les plus faibles ont été obtenus pour Ouled Mimoun (768 m, 0,17%) et Sebdou (1210 m, 0,20 %).

Compte tenu de ces résultats, nous pouvons conclure que les échantillons prélevés à une altitude située entre 40 à 400 m produisent une quantité plus importante d'huile (rendements varient entre 0,30 et 0,51%) que ceux prélevés à une altitude plus élevée de 500 et 1200 m (rendements variant entre 0,13 et 0,31%).

Les teneurs en huile essentielle des feuilles fraîches et sèches de *Tetraclinis articulata* provenant de différentes stations du Maroc varient de 0,06 à 0,81% et sont donc, très proches de nos valeurs **(Barrero *et al.*, 2005 ; Bourkhiss *et al.*, 2007b ; 2007c ; Bourkhiss *et al.*, 2009a ; 2009b ; Achak *et al.*, 2009)**. De même, la teneur en huile essentielle obtenue par deux méthodes d'extraction différentes (HD et SFE) des feuilles de la même espèce récoltée dans deux régions différentes en Tunisie varie de 0,06 à 0,11% pour HD et de 0,16 à 0,25% pour SFE **(Ben Jemia *et al.*, 2012 ; Herzi *et al.*, 2013)**. Nous avons constaté également que les teneurs en huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* provenant de différentes

régions d'Algérie (0,22 à 0,78%) **(Benali Toumi *et al.*, 2011 ; Chikhoune *et al.*, 2013 ; Djouahri *et al.*, 2013a ; Djouahri *et al.*, 2015)** sont également très proches des valeurs que nous avons obtenues.

Il est à noter également que les rendements en huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltés dans la région de Ghazaouet (0,04-0,75% ; Moy : 0,30%), confirment les résultats obtenus par **Abi-Ayad *et al.*** en **2013**. Ces auteurs rapportent une teneur en huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltés dans la même région de l'ordre de 0,33%. Par contre, la teneur en huile essentielle de la même espèce récoltée dans la région d'Ouled Mimoun, rapportée par **Benali Toumi *et al.*** en **2011**, est plus importante que celles que nous avons observées (0,78% contre une moyenne de l'ordre de 0,17%).

**Tableau 3 : Rendements (en %) en huiles essentielles de 50 échantillons des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* des différentes stations**

| **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| H 1 | 0,42 | S 1 | 0,13 | OM 1 | 0,10 | BK 1 | 0,46 |
| H 2 | 0,46 | S 2 | 0,13 | OM 2 | 0,28 | BK 2 | 0,60 |
| H 3 | 0,26 | S 3 | 0,10 | OM 3 | 0,11 | BK 3 | 0,86 |
| H 4 | 0,52 | S 4 | 0,30 | OM 4 | 0,35 | BK 4 | 0,20 |
| / | / | S 5 | 0,34 | OM 5 | 0,10 | BK 5 | 0,42 |
| / | / | / | / | OM 6 | 0,10 | BK 6 | 0,50 |
| **Moy ± ET** | **0,42 ± 0,11** | **Moy ± ET** | **0,20 ± 0,11** | **Moy ± ET** | **0,17 ± 0,11** | **Moy ± ET** | **0,51± 0,22** |
| **Altitude** | **165 m** | **Altitude** | **1210 m** | **Altitude** | **768 m** | **Altitude** | **408 m** |
| | | | | | | | |
| **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** |
| ST 1 | 0,64 | G 1 | 0,23 | AK 1 | 0,45 | Sab 1 | 0,04 |
| ST 2 | 0,20 | G 2 | 0,32 | AK 2 | 0,35 | Sab 2 | 0,07 |
| ST 3 | 0,54 | G 3 | 0,50 | AK 3 | 0,40 | Sab 3 | 0,08 |
| ST 4 | 0,20 | G 4 | 0,20 | AK 4 | 0,30 | Sab 4 | 0,30 |
| ST 5 | 0,20 | G 5 | 0,06 | AK 5 | 0,21 | Sab 5 | 0,24 |
| ST 6 | 0,10 | G 6 | 0,04 | AK 6 | 0,30 | Sab 6 | 0,12 |
| / | / | G 7 | 0,75 | AK 7 | 0,15 | Sab 7 | 0,03 |
| / | / | / | / | / | / | / | / |
| **Moy ± ET** | **0,31± 0,22** | **Moy ± ET** | **0,30 ± 0,25** | **Moy ± ET** | **0,31± 0,10** | **Moy ± ET** | **0,13 ± 0,10** |
| **Altitude** | **497 m** | **Altitude** | **42 m** | **Altitude** | **779 m** | **Altitude** | **495 m** |

H : Honaïne, S : Sebdou, OM : Ouled Mimoun, BK : Beni Khalled, ST : Souk Tlata, G : Ghazaouet, AK : Aïn Kebira, Sab : Sabra, Moy : Moyenne, ET : Ecart-Type

### I.1.2. Etude de la composition et de la variabilité chimique de l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*

Afin de déterminer la composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*, nous avons analysé le profil chromatographique de 50 échantillons provenant d'arbres adultes situés dans huit stations de la région de Tlemcen (nord-ouest d'Algérie).

Dans une première partie, nous présentons l'analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle qui a été effectuée par une combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques.

Dans une seconde partie, nous décrivons la caractérisation chimique des huiles essentielles de 50 échantillons qui a été soumise à une analyse statistique afin de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons étudié l'évolution de la composition chimique des échantillons provenant d'un seul pied de *Tetraclinis articulata* au cours d'une année.

#### I.1.2.1. Analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*

Nous avons procédé à une analyse de l'échantillon Sab 45 en appliquant conjointement une technique chromatographique sur deux colonnes de polarité différente (CPG-Ir) et deux techniques spectroscopiques (RMN $^{13}C$ et CPG-SM). La caractérisation de cette huile essentielle a été réalisée par RMN $^{13}C$ sans séparation préalable des constituants. Les spectres des huiles essentielles sont enregistrés et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. L'interrogation de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire, nous a permis d'identifier 17 composés qui représentent un pourcentage de l'ordre de 93,5%. Les constituants identifiés par RMN $^{13}C$, sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonne polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés.

L'analyse de six autres échantillons par RMN $^{13}C$, nous a permis de confirmer cinq composés supplémentaires, à savoir : *p*-cymène, α-copaéne, γ-muurolène, δ-cadinène et *épi*-cubénol.

Par ailleurs, l'application de la CPG-SM, pour l'analyse de l'échantillon Sab 45, nous a permis d'identifier également 13 autres composés minoritaires de teneurs très faibles qui ne peuvent pas être identifiés par RMN $^{13}C$. Une fois identifiés, ces composés sont aisément

repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire, ce qui permet leur quantification. Dix de ces composés sont des monoterpènes dont 7 hydrocarbonés et 3 oxygénés. Les trois autres composés identifiés sont des sesquiterpènes dont un hydrocarboné.

En conclusion, nous avons identifié, au total, 35 composés dans les huiles essentielles *de Tetraclinis articulata* représentant 97,5% de la composition chimique globale dont 85,7% sont des monoterpènes et 11,8% sont des sesquiterpènes (**Tableau 4**).

Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes et l'α-pinène (23,6%), l'acétate de bornyle (20,7%) et le camphre (17,3%) sont les composés nettement majoritaires. Le limonène (9,5%), le myrcène (3,8%) et le camphène (1,1%) sont présents en quantité appréciable. Par ailleurs, les autres monoterpènes oxygénés présents en teneurs appréciables sont : le bornéol (2,7%), l'acétate d'α-terpinyle (1,5%) et l'hydrate de camphène (0,9%). La famille des sesquiterpèniques oléfiniques est dominée par : le *(E)*-β-caryophyllène (4,7%), l'α-humulène (1,3%) et le germacrène D (1,1%). L'oxyde de caryophyllène est de loin le sesquiterpène oxygéné le plus important en quantité avec une teneur de l'ordre de (2,3%).

**Tableau 4 : Composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata***

| COMPOSES* | IR[a] | IR[p] | (%) | Mode d'identification |
|---|---|---|---|---|
| Tricyclène | 922 | 1015 | 0,7 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| **α-Pinène** | 932 | 1015 | **23,6** | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Camphène | 945 | 1065 | 1,1 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Sabinène | 966 | 1123 | 0,4 | IR,SM |
| β-Pinène | 972 | 1112 | 0,7 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Myrcène | 982 | 1161 | 3,8 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| δ-3-Carène | 1006 | 1149 | Tr | IR, SM |
| α-Terpinène | 1010 | 1181 | 0,2 | IR, SM |
| *p*-Cymène | 1013 | 1271 | 0,2 | IR, SM, *RMN $^{13}C$* |
| Limonène | 1023 | 1202 | 9,5 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| (*E*)-β-Ocimène | 1037 | 1250 | Tr | IR, SM |
| γ-Terpinène | 1049 | 1245 | 0,4 | IR, SM |
| *p*-Cymenène | 1074 | 1436 | 0,1 | IR, SM |
| Terpinolène | 1080 | 1283 | 0,4 | IR, SM |
| α-Campholénal | 1105 | 1488 | 0,3 | IR, SM |
| **Camphre** | 1123 | 1514 | **17,3** | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Trans-verbenol | 1124 | 1680 | 0,1 | IR, SM |
| Hydrate de camphène | 1133 | 1591 | 0,9 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Bornéol | 1150 | 1694 | 2,7 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Terpinéol-4 | 1162 | 1597 | 0,8 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Terpinéol | 1173 | 1691 | 0,3 | IR, SM |
| **Acétate de bornyle** | 1271 | 1579 | **20,7** | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Acétate d'α-terpinyle | 1333 | 1691 | 1,5 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Copaène | 1377 | 1491 | 0,3 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| (*E*)-β-Caryophyllène | 1419 | 1595 | 4,7 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Humulène | 1451 | 1665 | 1,3 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| γ-Muurolène | 1471 | 1684 | 0,1 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Germacrène D | 1477 | 1704 | 1,1 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Muurolène | 1494 | 1723 | Tr | IR, SM |
| γ-Cadinène | 1507 | 1753 | 0,8 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| δ-Cadinène | 1515 | 1755 | 0,2 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Oxyde de caryophyllène | 1571 | 1976 | 2,3 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Oxyde d'humulène | 1595 | 2032 | 0,5 | IR, SM |
| *épi*-Cubénol | 1616 | 2057 | 0,4 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| τ-Cadinol | 1626 | 2162 | 0,1 | IR, SM |
| Monoterpènes hydrocarbonés | | | 41,1 | |
| Monoterpènes oxygénés | | | 44,6 | |
| Sesquiterpènes hydrocarbonés | | | 8,5 | |
| Sesquiterpènes oxygénés | | | 3,3 | |
| **Total (%)** | | | **97,5** | |

* L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP1). IR[a] et IR[p] : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20). Tr : Trace, *$^{13}C$ NMR* (en italique) : Composés identifiés dans un des six autres échantillons identifiés par RMN.

L'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* est caractérisée par la présence majoritaire de l'α-pinène, de l'acétate de bornyle et du camphre.

Comme indiqué dans la littérature, ces trois composés sont les constituants les plus abondants dans l'huile essentielle de thuya collecté dans différentes régions au Maroc : **(Bourkhiss *et al.*, 2007b ; 2007c ; Barrero *et al.*, 2005 ; Bourkhiss *et al.*, 2009a ; 2009b ; Achak *et al.*, 2009)** et en Tunisie **(Ben Jemia *et al.*, 2012)** à l'exception d'un échantillon de provenance de Marrakech qui contient l'acétate de bornyle (26,8%) et le camphre (26,8%) comme composés majoritaires, suivis par l'α-pinène (7,2%) et le bornéol (6,4%) **(El Jemli *et al.*, 2016)**. Par contre, une autre étude réalisée en Tunisie rapporte une teneur élevée en α-pinène (24,9%) suivi de l'acétate de linalyle (21,4%), avec l'absence totale du camphre et de l'acétate de bornyle **(Herzi *et al.*, 2013)**. Il est à noter que l'acétate de linalyle est totalement absent dans notre échantillon. Par ailleurs, au Canada, un échantillon d'huile essentielle des feuilles contient une quantité importante en 3-carène (18,3%) et en β-myrcène (11,7%), après l'α-pinène (32,7%). Par contre, l'acétate de bornyle est présent en faible teneur (5,9%) **(Kiliç, 2014)**.

Les huiles essentielles de thuya originaire d'Algérie contiennent de l'acétate de bornyle, de l'α-pinène et du camphre comme composés majoritaires **(Chikhoune *et al.*, 2013 ; Djouahri *et al.*, 2013a ; Djouahri *et al.*, 2015)** et plus rarement du bornéol en quantité appréciable **(Benali Toumi *et al.*, 2011)**. Par contre, un échantillon prélevé de Messer (Sidi Bel Abbès) renferme le camphre (19,6%) et l'acétate de bornyle (18,7%) comme composés majoritaires, du bornéol en teneur non négligeable (6,3%) et une faible teneur en α-pinène (3,2%) **(Larabi *et al.*, 2015)**. En revanche, l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées dans la région de Ghazaouet (Tlemcen) est caractérisée par la présence très majoritaire d'acétate de bornyle (52,1%), une très faible quantité de camphre (2,1%) et l'absence totale de l'α-pinène. Le camphre (31,6%) et l'acétate de bornyle (17,1%) sont les principaux composants d'un échantillon d'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées dans la région d'Ouled Mimoun (Tlemcen), suivi du bornéol (14,3%). Par contre, la composition chimique de notre échantillon diffère de celle de l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées dans la région d'Oujlida (Tlemcen), dominée par l'α-pinène (32,0%) suivi du cédrol (11,0%) et du δ-3-carène (9,5%), alors que la teneur en acétate de bornyle (0,7%) est très faible et le camphre est totalement absent **(Bouayad Alam *et al.*, 2014)**.

### I.1.2.2. Variabilité chimique de l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*

La relation particulière existant entre la composition chimique d'une part et les caractères botaniques d'autre part, a donné naissance à une discipline et à une classification très utile « la chimiotaxonomie » **(Wichtl et Anton, 1999)**.

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*, nous avons analysé 50 échantillons d'huile essentielle préparées à partir des parties aériennes (feuilles et fleurs) prélevées dans huit stations différentes dans la région de Tlemcen, situées entre 42 m et 1210 m d'altitude ; Zone littorale : [Honaïne (échantillons H1-H4), Beni Khellad (échantillons BK17-BK22), Souk Tlata (échantillons ST23-ST28), Ghazaouet (échantillons G29-G35)] ; Zone montagneuse [Sebdou (échantillons S5-S10), Ouled Mimoun (échantillons OM11-OM16), Aïn Kebira (échantillons AK36-AK42) et Sabra (échantillons Sab43-Sab50)].

Chacun des 50 échantillons a été soumis à l'analyse de la CPG (FID) et des indices de rétention (IR) de différents composants ont été mesurés sur deux colonnes de polarité différente. Parmi eux, 7 échantillons, choisis sur la base de leur profil chromatographique, ont été également analysés par RMN $^{13}C$ dont un également par CPG-SM (étude détaillée). Au total, 35 composants ont été identifiés et sont les mêmes que ceux identifiés lors de l'étude présentée dans le paragraphe précédent, représentant de 94,8 à 99,1% de la composition totale (**Annexe 1**). Les résultats de la composition chimique des 50 échantillons ont été soumis à l'analyse statistique : une analyse en composantes principales (ACP) associée à une classification hiérarchique ascendante (CHA ou dendrogramme) et à une partition (K-means).

Ces huiles essentielles sont riches en monoterpènes représentant (57,1-95,4%) de la composition chimique totale. Les échantillons sont qualitativement homogènes. Ces monoterpènes sont caractérisés par la prédominance de l'α-pinène (9,2-56,5%) du camphre (0,5-40,3%) et de l'acétate de bornyle (1,2-45,1%) (**Tableau 5**). D'autres monoterpènes sont présents en proportion appréciable : le myrcène (jusqu'à 9,7%), le limonène (jusqu'à 12,5%) et le bornéol (jusqu'à 12,9%). Certains échantillons d'huiles essentielles montrent ponctuellement des teneurs importantes pour les sesquiterpènes comme le *(E)*-β-caryophyllène (jusqu'à 13,3%) et le germacrène D (jusqu'à 14,2%) (**Tableau 5**).

**Tableau 5 : Composés majoritaires identifiés dans les 50 échantillons d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata***

| Composés identifiés | $Ir^a$ | $Ir^p$ | Moyenne ± Ecart type | Minimum (%) | Maximum (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| α-Pinène | 932 | 1015 | 29,3 ± 10,1 | 9,2 | 56,5 |
| Myrcène | 982 | 1161 | 4,1 ± 2,0 | 1,6 | 9,7 |
| Limonène | 1023 | 1202 | 7,4 ± 2,24 | 3,6 | 12,5 |
| Camphre | 1123 | 1514 | 12,8 ± 10,3 | 0,5 | 40,3 |
| Bornéol | 1150 | 1694 | 3,0 ± 2,9 | 0,2 | 12,9 |
| Acétate de bornyle | 1268 | 1575 | 19,9 ± 9,9 | 1,2 | 45,1 |
| *(E)*-β-Caryophyllène | 1419 | 1595 | 3,7 ± 2,9 | 0,0 | 13,3 |
| Germacrène D | 1477 | 1704 | 2,5 ± 3,2 | 0,0 | 14,2 |

L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP1). $Ir^a$ et $Ir^p$ : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20).

En confrontant nos résultats avec les données décrites dans la littérature (**Tableau 6**), nous constatons que la composition chimique de nos échantillons se rapproche de celles citées dans la plupart des travaux antérieurs. En revanche, **Chikhoune *et al.*** et **Abi-Ayad *et al.*** *en* **2013**, ont montré une forte teneur en acétate de bornyle (40,2-59,2% et 52,1% ; respectivement). De même, les pourcentages en bornéol dans nos échantillons sont proches de ceux observés dans deux échantillons récoltés au Maroc **(Barrero *et al.*, 2005 ; El Jemli *et al.*, 2016)**, dans les échantillons prélevés en Tunisie **(Sliti *et al.*, 2016)** et dans deux autres échantillons récoltés en Algérie **(Benali Toumi *et al.*, 2011)**. Il est à noter que ce composé est totalement absent dans le reste des travaux. Par contre, l'étude réalisée par **Herzi *et al.*** en **2013** est la seule qui a montré la présence d'acétate de linalyle comme composé majoritaire avec un teneur variant entre 1,7 et 21,4%, après l'α-pinène (24,9-31,3%). De même, la composition chimique de nos échantillons diffère également de celle de l'huile essentielle du Canada qui est caractérisé par la prédominance de l'α-pinène (32,7%), suivi du 3-carène (18,3%), du β-mycène (11,7%) et de l'acétate de bornyle (5,9%) **(Kiliç, 2014)**. Enfin, la composition chimique de l'huile essentielle *Tetraclinis articulata* récolté dans la région de Tlemcen et rapporté par **Bouayad Alam *et al.*** en **2014**, diffère totalement de nos échantillons. Elle est caractérisée par la présence du cédrol (11,0%) et de δ-3-carène (9,6%) parmi les composés majoritaires.

**Tableau 6 : Composés majoritaires dans l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* des différentes régions selon la littérature**

| Composés / Publications | α-Pinène | Acétate de bornyle | Camphre | Bornéol | Limonène | *(E)*-β Caryophyllène | Germacrène D | Acétate de linalyle | Cédrol | δ-3-Carène | 3-Carène | β -Myrcène |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Bourkhiss *et al*., 2007b Maroc** | 23,5% | 30,7% | 17,3% | 4,6% | 5,9% | ------- | Tr | ------- | ------- | Tr | ------- | ------- |
| **Bourkhiss *et al*., 2009a Maroc** | 16,8% | 30,6% | 18,6% | 4,7% | 5,7% | ------- | 0,3% | ------- | ------- | ------- | ------- | 2,0% |
| **Bourkhiss *et al*., 2007c Maroc** | ------- | 25,4% | 31,6% | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- |
| **Achak *et al*., 2009 Maroc** | 41,0% / 23,0% | 20,6% / 36,4% | 6,9% / 9,1% | 3,6% / 4,1 | 4,9% / 9,7% | ------- | 0,1% / 0,1% | ------- | ------- | Tr / Tr | ------- | 2,1%/ 2,2% |
| **Barrero *et al*., 2005 Maroc** | 1,3% | 16,5% | 19,1% | 9,6% | 0,5% | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | 0,4% |
| **El Jemli *et al*., 2016 Maroc** | 7,2% | 26,8% | 22,4% | 6,8% | 3,8% | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- |
| **Ben Jemia *et al*., 2012 Tunisie** | 24,5% | 31,4% | 20,3% | 1,5% | 3,1% | 1,0% | 0,2% | ------- | ------- | 0,1% | ------- | 0,4% |
| **Herzi *et al*., 2013 HD, SFE (90 bar) Tunisie** | 24,9 /31,3% | ------- | ------- | ------- | 0,2%/ 0,2% | 2,5% / 4,2% | ------- | 21,4% / 18,2% | ------- | ------- | 3,4% / 3,4% | 0,5/0,2% |
| **Sliti *et al*., 2016 Tunisie** | 26,3-36,6% | 19,0-25,4% | 5,5-15,3% | 3,0-6,8% | 5,3-8,9% | 0,2-5,1% | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | 3,9-6,6% |
| **Kiliç, 2014 Canada** | 32,7% | 5,9% | 1,0% | 0,8% | 5,6% | 0,3% | ------- | ------- | 0,4% | ------- | 18,3 % | 11,7% |
| **Chikhoune *et al*., 2013 (Hammam Melouane/ Tipaza) Algérie** | 24,9% / 19,8% | 40,2% / 59,2% | 2,3% / 4,8% | 0,4% / 0,6% | 9,6% / 5,9% | 6,6% / 2,3% | 0,5% / 0,2% | ------- | ------- | Tr / Tr | ------- | 6,7% / 1,3% |
| **Djouahri *et al*., 2013a HD, MAHD (Aïn Defla) Algérie** | 23,6% / 12,5% | 24,4% / 32,4% | 18,3% / 21,4% | 4,0% / 2,2% | 7,0% / 4,3% | 0,1-0,6% | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | 5,5% |
| **Djouahri *et al*., 2015 (quatre régions) Algérie** | 16,3-25,3% | 17,6-20,6% | 17,2-21,4% | 0,7-1,5% | 5,7-7,3% | 0,3-0,6% | ------- | ------- | ------- | Tr-0,7% | ------- | ------- |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Larabi *et al.*, 2015 (Sidi Bel Abbès) Algérie** | 3,2% | 18,7% | 19,6% | 6,3% | 2,8% | 7,1% | 7,6% | ------- | ------- | ------- | ------- | 1,6% |
| **Benali Toumi *et al.*, 2011 (Sidi Bel Abbès/Tlemcen/ Tiaret) Algérie** | 3,7% / 6,5% / 11,3% | 25,8% / 17,1% / 24,6% | 26,7% / 31,6% / 23,4% | 12,9% / 14,3% / 6,6% | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- |
| **Abi-Ayad *et al.*, 2013 (Tlemcen) Algérie** | ------- | 52,1% | 2,1% | 2,1% | 0,6% | 7,5% | 5,6% | ------- | 4,5% | ------- | ------- | 0,1% |
| **Bouayad Alam *et al.*, 2014 (Tlemcen) Algérie** | 32,0% | 0,7% | 0,3% | ------- | 4,3% | 4,0% | 1,3% | ------- | 11,0% | ------- | 9,6% | 3,3% |
| **Boussaïd *et al.*, 2015 (Tlemcen) Algérie** | 9,2-56,5% | 1,2-45,1% | 0,5-40,3% | 0,2-12,9% | 3,6-12,5% | 0,0-13,3% | 0,0-14,2% | ------- | ------- | 0,0-1,0% | ------- | 1,6-9,7% |

**Tr : Trace**

Ayant observé des variations importantes des teneurs des trois composés majoritaires (α-pinène, camphre et acétate de bornyle) au sein de l'échantillonnage, nous avons soumis les résultats à une analyse statistique dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*. Ainsi, les compositions des 50 échantillons d'huile essentielle ont été soumis à trois tests statistiques : une analyse en composantes principales (ACP) (**Figure 16**), une partition utilisant la méthode du *K*-means et une classification hiérarchique ascendante (CHA, dendrogramme : **Figure 17**).

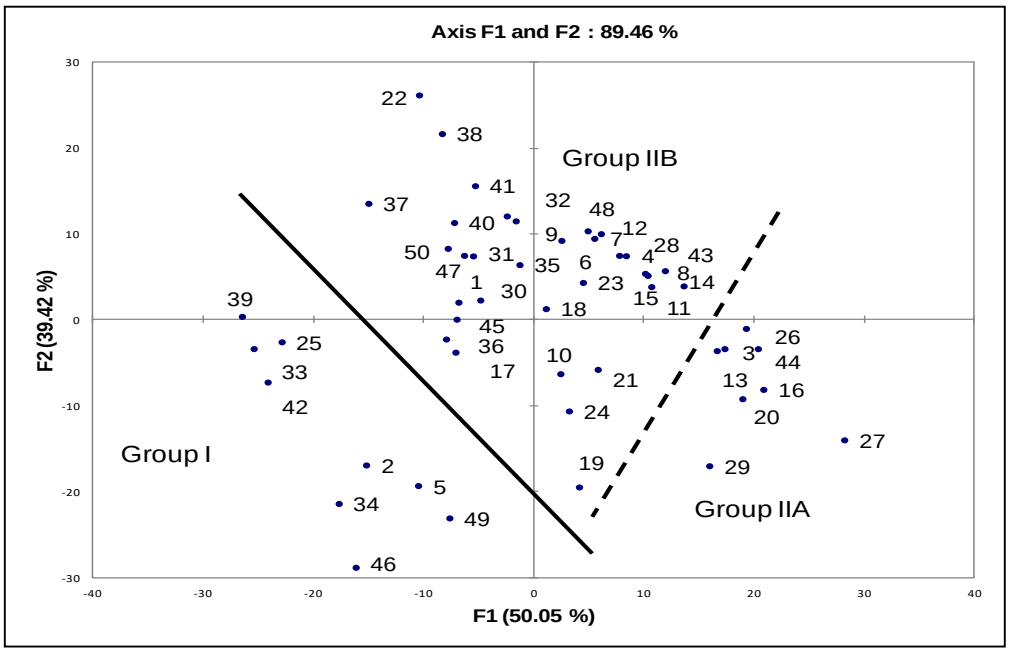



**Figure 16 : Analyse en composantes principales de 50 échantillons des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata***

Bien que les compositions de ces échantillons soient largement dominées par l'α-pinène (9,2-56,5%), le camphre (0,5-40,3%) et l'acétate de bornyle (1,2-45,1%), la combinaison des résultats de la classification ascendante hiérarchique et de l'analyse en composantes principales pour laquelle le plan défini par les deux premiers axes, décrit 89,5% du total de la variance des populations, permet de définir deux principaux groupes d'huile essentielle de thuya (**Tableau 7**). En parallèle, le groupe II a été divisé en deux sous-groupes IIA et IIB (**Tableau 7**).

- Les échantillons du **groupe I** (9 des 50 échantillons : H3, S1, ST3, G5, G6, AK4, AK7, Sab4 Sab7) sont caractérisés par la prédominance du camphre (M = 30,9% ; ET = 4,2), suivi par l'α-pinène (M = 19,1% ; ET = 7,6) et l'acétate de bornyle (M = 11,4% ; ET = 9,6). Les échantillons de ce groupe contiennent également deux autres monoterpènes : le limonène (M = 7,3% ; ET = 2,6) et le bornéol (M = 6,2% ; ET = 4,1) à des teneurs appréciables. Plusieurs

sesquiterpènes hydrocarbonés, comme *(E)*-β-caryophyllène (M = 1,2% ; ET = 0,6) et germacrène D (M = 0,4% ; ET = 0,4) sont également présents en faibles teneurs.

-**Le groupe II** est subdivisé en deux sous-groupes :

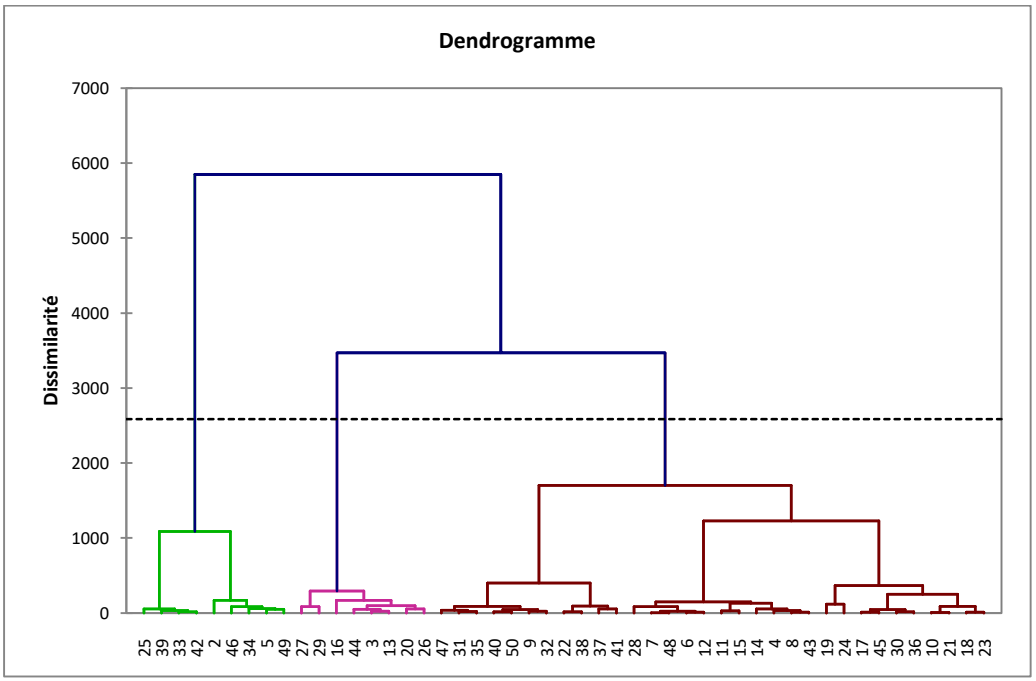
- **Le sous-groupe IIA** (8 des 50 échantillons : H4, OM3, OM6, BK4, ST4, ST5, G1, Sab2) est caractérisé par une teneur très élevée en α-pinène (M = 45,4% ; ET = 5,6), suivi par l'acétate de bornyle (M = 10,5% ; ET = 4,6). Nous notons en occurrence la présence du germacrène D (M = 5,1% ; ET = 4,7). Ce sous-groupe contient également des proportions comparables de limonène (M = 6,8% ; ET = 2,7), de camphre (M = 4,0% ; ET = 3,8), de myrcène (M = 3,9% ; ET = 2,4) et de*(E)*-β-caryophyllène (M = 6,3% ; ET = 2,3). En revanche, de faibles quantités en bornéol (M = 1,1% ; ET = 1,2) ont été détectées.
- **Le sous-groupe IIB**, le plus important (33 des 50 échantillons : H(1-5), S(2-6),OM(1-2-4-5), BK(1-2-3-5-6), ST(1-2-6), G(2-3-4-7), AK(1-2-3-5-6), Sab(1-3-5-6-8)), rassemble les compositions caractérisées par des teneurs comparables en α-pinène (M = 28,2% ; ET = 6,4), et en acétate de bornyle (M = 24,5% ; ET = 7,7). Le camphre (M = 10,0% ; ET = 6,0) et le limonène (M = 7,6% ; ET = 2,1) sont également présents en quantités appréciables. Les échantillons de ce sous-groupe contiennent d'autres composés importants, à savoir : le myrcène, le bornéol, le *(E)*-β-caryophyllène et le germacrène D.

Ainsi, l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *T. articulata* poussant spontanément dans la région de Tlemcen présente une variabilité chimique avec trois types de compositions. Les deux tiers des échantillons sont dominées par le couple α-pinène/acétate de bornyle. Le camphre et le limonène sont également présents en quantités appréciables. Le reste des échantillons sont dominés par l'α-pinène ou le camphre. La variabilité chimique de *T. articulata* semble donc être indépendante des conditions pédoclimatiques. Par ailleurs, ce travail est la première étude réalisée sur l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *T. articulata* avec un échantillonnage important (50 échantillons) dans une région bien définie.

La comparaison de nos résultats avec les données de la littérature révèle que la composition chimique des échantillons du groupe I semble originale, puisque aucun travail ne rapporte une teneur élevée en camphre suivi par l'α-pinène. Il en est de même pour le sous-groupe B.

Par contre, la composition des échantillons du sous-groupe IIA est peu courante puisqu'elle est proche uniquement de celle rapportée par **Achak *et al*.** en **2013**. Néanmoins,

ces auteurs avancent une absence totale des composés présents en quantité appréciables cités dans ce sous-groupe.




Les échantillons sont regroupés en utilisant la technique de Ward avec une mesure de distance Euclidienne

**Figure 17 : Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse de Cluster de 50 échantillons des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata***

**Tableau 7 : Composés majoritaires identifiés dans les 50 échantillons des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata***

| Constituants | Groupe I (9 échantillons) | | | | Groupe II (41 échantillons) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Sous-groupe IIA (8 échantillons) | | | | Sous-groupe IIB (33 échantillons) | | | |
| | Moy | ET | Min | Max | Moy | ET | Min | Max | Moy | ET | Min | Max |
| α-Pinène | **19,1** | 7,6 | 9,2 | 29,3 | **45,4** | 5,6 | 40,0 | 56,5 | **28,2** | 6,4 | 16,0 | 41,6 |
| Myrcène | 3,4 | 1,5 | 1,8 | 6,0 | 3,9 | 2,4 | 2,2 | 9,7 | 4,3 | 2,0 | 1,6 | 8,7 |
| Limonène | 7,3 | 2,6 | 3,6 | 11,7 | 6,8 | 2,7 | 4,2 | 12,1 | 7,6 | 2,1 | 4,5 | 12,5 |
| Camphre | **30,9** | 4,2 | 26,0 | 40,3 | **4,0** | 3,8 | 0,5 | 12,7 | **10,0** | 6,0 | 1,6 | 22,6 |
| Bornéol | 6,2 | 4,1 | 0,9 | 12,9 | 1,1 | 1,2 | 0,2 | 3,9 | 2,5 | 2,0 | 0,5 | 7,0 |
| Acétate de bornyle | **11,4** | 9,6 | 1,2 | 23,6 | **10,5** | 4,6 | 5,3 | 18,5 | **24,5** | 7,7 | 6,5 | 45,1 |
| *(E)*-β-Caryophyllène | 1,2 | 0,6 | 0,6 | 2,4 | 6,3 | 2,3 | 2,5 | 9,6 | 3,8 | 2,9 | 0,0 | 13,3 |
| Germacrène D | 0,4 | 0,4 | 0,0 | 1,3 | 5,1 | 4,7 | 0,2 | 14,2 | 2,4 | 2,7 | 0,1 | 12,2 |

Moy : Moyenne, ET : Ecart type, Min : Valeur minimale, Max : Valeur maximale.

### I.1.3. Etude de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles d'un pied de *Tetraclinis articulata* au cours d'une année

Dans cette partie, nous avons déterminé la composition chimique des huiles essentielles des feuilles récoltées à partir d'un même pied dans la station d'Aïn Kebira (AK37), région de Tlemcen au cours d'une année. Nous avons effectué un seul prélèvement chaque mois. Ainsi, nous avons réalisé douze échantillons à partir du mois de mars 2014 (pleine floraison) jusqu'au mois du février 2015.

#### I.1.3.1. Rendement d'extraction

Les huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* ont été obtenues par l'hydro-distillation de feuilles broyées. Elles sont d'aspect liquide et de couleur jaune pâle. Les rendements sont calculés par rapport à la matière végétale sèche et représentés dans le tableau (8).

**Tableau 8 : Rendements (en %) en huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* au cours d'une année (AK37)**

| Echantillon par mois | Rendements (en %) | Echantillon par mois | Rendements (en %) |
|---|---|---|---|
| AK37 Mars (pleine floraison) | 0,35 | Septembre | 0,42 |
| AK37 Avril | 0,16 | Octobre | 0,34 |
| AK37 Mai | 0,21 | Novembre | 0,47 |
| AK37 Juin | 0,57 | Décembre | 0,66 |
| AK37 Juillet | 0,29 | Janvier | 0,47 |
| AK37Août | 0,33 | Février | 0,40 |

D'après les résultats, nous avons constaté que les rendements en huile essentielle varient d'un mois à un autre (0,16 à 0,66%). Les rendements les plus importants sont observés pour les mois de juin et de décembre. Nous pouvons noter également que les rendements diminuent en pleine et à la fin de la floraison (mars à mai). Ceci confirme les résultats obtenus par **Sliti *et al.*** en **2016** puisqu'ils rapportent les plus faibles rendements au mois d'avril et de mai avec des pourcentages de l'ordre de 0,11 et 0,10% respectivement. Ces variations peuvent être dues à des variations climatiques d'un mois à l'autre.

#### I.1.3.2. Composition chimique de l'huile essentielle des échantillons d'un même pied au cours d'une année

Les douze échantillons d'huile essentielle récoltés à partir d'un même pied au cours d'une année (un prélèvement par mois) ont été analysés par CPG(Ir) (**Tableau 9**). Nous avons constaté que la composition est qualitativement homogène mais quantitativement différente. Cette importante variabilité concerne en particulier les composés majoritaires, à savoir : α-

pinène (11,4-25,2%), acétate de bornyle (8,6-41,1%) et camphre (2,2-22,5%). En effet, dans les deux premiers mois mars et avril où le pied de *Tetraclinis articulata* est en pleine floraison, l'acétate de bornyle est le composé majoritaire (34,5% et 41,1%, respectivement). Ce qui explique la forte teneur de ce composé de l'ordre de 52,1%, dans l'échantillon récolté à Ghazaouet (Tlemcen) au mois d'avril **(Abi-Ayad *et al.*, 2013)**. Ce constituant diminue (8,6%) brutalement à la fin de la fructification (septembre). Par contre, le camphre est élevé à la fin de la fructification (22,5%) puis diminue brusquement avant floraison, avec des pourcentages variant entre 2,2 et 4,9% (entre octobre et février). Le bornéol a le même comportement que le camphre. Le pourcentage en α-pinène est important du début jusqu'à la fin de la fructification puis diminue au cours de la floraison. Enfin, nous avons constaté que les teneurs en sesquiterpènes oléfiniques tels que : α-copaéne, sibérène, *(E)*-β-caryophyllène, α-humulène, germacrène D et δ-cadinène sont élevées de octobre à février (après fructification jusqu'au début de la floraison). En revanche, le tricyclène et le camphène sont plus importants durant la période de la fructification.

En revanche, **Sliti *et al.*** en **2016** ont décrit la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées à Karbous (Tunisie) sur quatre périodes différentes : janvier, avril, mai et novembre. Ils rapportent une faible variabilité quantitative concernant les composés majoritaires : α-pinène (32,3-36,6%), acétate de bornyle (19,0-23,4%) et camphre (5,5-7,9%). D'autres composés sont présents en quantités appréciables, il s'agit de : limonène (5,3-8,9%), β-myrcène (3,9-6,6%), bornéol (3,0-6,8%) et caryophyllène (0,2-5,1%).

Plus récemment, **Djouhri *et al.*** en **2016** ont étudié la composition chimique des huiles essentielles des feuilles récoltées avant et en pleine floraison, ainsi que pendant la fructification. Les auteurs avancent que l'α-pinène (16,4 ± 0,2-31,9 ± 0,4%) et le limonène (3,4 ± 0,1-9,5 ± 0,1%) sont les composés majoritaires en période de pleine floraison, alors que le camphre (16,1 ± 0,2-26,2 ± 0,3%) et l'acétate de bornyle (7,3 ± 0,3-15,2 ± 0,2%) sont les principaux constituants pendant la période de fructification.

Nos résultats sont différents de ceux de la littérature, Ceci est dû probablement au mode de récolte. En effet, le prélèvement est collectif et a été réalisé sur trois pieds pour chaque échantillon **(Sliti *et al.*, 2016)**, alors que nous avons constaté une variabilité intra station lors de l'étude de la composition chimique des 50 échantillons récoltés dans huit stations de la région de Tlemcen **(Boussaïd *et al.*, 2015)**.Cette variabilité peut donc conduire à des biais qui ne peuvent pas exister dans notre étude puisque nous n'avons utilisé que des pieds individuels et aucun échantillon collectif.

**Tableau 9 : Composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles récoltées à partir d'un même pied de *Tetraclinis articulata* au cours d'une année**

| **Composés identifiés** | **Ir$^a$** | **Ir$^p$** | AK37 Mars | AK37 Avril | AK37 Mai | AK37 Juin | AK37 Juillet | AK37 Août | AK37 Septembre | AK37 Octobre | AK37 Novembre | AK37 Décembre | AK37 Janvier | AK37 Février |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tricyclène | 919 | 1015 | 1,4 | 1,1 | 1,2 | **2,5** | **2,2** | **2,4** | **2,5** | 1,3 | 1,7 | 1,8 | 1,3 | 0,9 |
| **α-Pinène** | **932** | **1015** | **16,0** | **11,4** | **13,2** | **23,1** | **24,6** | **23,7** | **23,3** | **19,3** | **25,2** | **23,3** | **18,3** | **18,7** |
| Camphène | 942 | 1064 | 1,7 | 1,5 | 1,4 | **2,4** | **2,3** | **2,4** | **2,7** | 1,5 | 1,7 | 1,9 | 1,4 | 1,1 |
| Myrcène | 982 | 1161 | 2,3 | 1,7 | 1,2 | 1,7 | 1,4 | 1,7 | 1,5 | **2,7** | **2,8** | **2,9** | **2,2** | **2,6** |
| *p*-Cymène | 1013 | 1270 | 0,4 | 0,5 | 1,3 | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Limonène | 1023 | 1202 | 6,7 | 5,8 | 8,6 | 6,1 | 5,9 | 6,3 | 6,5 | 7,7 | 8,6 | 8,6 | 8,1 | 9,7 |
| **Camphre** | **1123** | **1514** | **16,4** | **14,8** | **9,7** | **11,0** | **11,5** | **10,3** | **22,5** | **4,9** | **3,2** | **4,0** | **4,7** | **2,2** |
| Hydrate de camphène | 1131 | 1591 | 1,2 | 1,2 | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,9 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,2 |
| Bornéol | 1150 | 1694 | 4,1 | 6,1 | 6,5 | 4,7 | 5,4 | 5,0 | **12,0** | 2,5 | 1,8 | 2,0 | 2,6 | 1,8 |
| Terpinéol-4 | 1160 | 1597 | 1,0 | 0,9 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,2 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 |
| **Acétate de bornyle** | **1269** | **1575** | **34,5** | **41,1** | **35,9** | **26,7** | **25,0** | **26,5** | **8,6** | **26,7** | **22,0** | **23,8** | **24,6** | **22,4** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1330 | 1691 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,9 | 1,1 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 1,0 |
| α-Copaéne | 1373 | 1491 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | **0,7** | **1,0** | **0,8** | **0,9** | **1,2** |
| Sibérène | 1397 | 1545 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | **1,2** | **1,6** | **1,2** | **1,4** | **1,8** |
| *(E)*-β-Caryophyllène | 1419 | 1595 | 1,8 | 1,2 | 1,2 | 1,7 | 1,0 | 2,1 | 0,9 | **7,4** | **10,2** | **8,3** | **8,7** | **12,7** |
| α-Humulène | 1447 | 1665 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | **2,0** | **2,4** | **2,0** | **2,2** | **3,1** |
| Germacrène D | 1477 | 1704 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | Tr | 0,8 | 0,1 | **4,0** | **3,5** | **3,9** | **4,1** | **5,7** |
| δ-Cadinène | 1511 | 1755 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,2 | 0,1 | **1,0** | **0,8** | **0,8** | **0,9** | **1,5** |
| Oxyde de caryophyllène | 1567 | 1974 | 2,2 | 3,1 | 4,3 | 2,3 | 2,4 | 2,0 | 1,4 | 2,2 | 1,3 | 1,4 | 2,9 | 1,5 |

L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP1). Ir$^a$ et Ir$^p$ : Indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20).

## I.2. Etude de la composition et de la variabilité chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata*

Nous avons récolté 40 échantillons de cônes en mois de septembre 2014 dans les mêmes stations que les parties aériennes :

- Zone littorale [Souk Tlata (échantillons ST1-ST5), Honaïne (échantillons H16-H20), Beni Khellad (échantillons BK31-BK35), Ghazaouet (échantillons G36-G40)] ;
- Zone montagneuse [Sabra (échantillons Sab6-Sab10) ; Aïn Kebira (échantillons AK11-AK15) ; Ouled Mimoun (échantillons OM21-OM25) et Sebdou (échantillons S26-S30)].

### I.2.1. Rendements d'extraction

Les huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* ont été obtenues par l'hydro-distillation des cônes écrasés, les rendements sont calculés par rapport à la matière végétale sèche et représentés dans le tableau (10). Ces huiles essentielles sont liquides et de couleur jaune pâle.

Les rendements en huile essentielle des cônes calculés à partir de la matière sèche, varient rigoureusement d'un échantillon à l'autre, entre 0,17 et 1,13%. Ces rendements sont plus importants que ceux obtenus avec les parties aériennes (0,03-0,86%).

Nous avons observé également une grande variation des teneurs en huiles essentielles au sein d'une même station, comme par exemple : Souk Tlata (0,19-0,91%), Sebdou (0,26-1,13%), Ghazaouet (0,53-1,11%) et Sabra (0,23-0,91%) (**Tableau 10**). Par ailleurs, les rendements moyens sont presque proches dans cinq stations variant entre 0,53% et 0,63%. Nous avons observé que la teneur moyenne en huiles essentielles la plus élevée est obtenue dans la station de Ghazaouet (0,78%). Par contre, les stations de Honaïne et de Sabra sont caractérisées par des rendements moyens faibles de l'ordre de 0,24% et 0,43%, respectivement.

Par comparaison de nos résultats avec les travaux antérieurs, nous avons constaté que nos rendements sont nettement supérieurs que celui obtenu par hydrodistillation des cônes de provenance de Tunisie (0,05%) **(Tékaya-Karoui *et al.*, 2007)**. Par contre, la teneur en huile essentielle des cônes de cette même espèce récoltée dans la région de Msida (Malte) est de l'ordre de 0,31% **(Buhagiar *et al.*, 2000)**. Ce rendement est proche de nos résultats. Enfin, **Chikhoune *et al.*** en **2013**, rapportent des teneurs en huiles essentielles des cônes récoltés dans deux stations de la région d'Alger plus importants de l'ordre de 0,8 et 1,6%.

Ainsi, les rendements en huiles essentielles varient suivant diverses conditions, à savoir : l'environnement, l'origine géographique et la période de récolte **(Svoboda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2001)**.

**Tableau 10 : Rendements (en %) en huiles essentielles de 40 échantillons de cônes de *Tetraclinis articulata* des différentes stations**

| Echantillon | Rendement | Echantillon | Rendement | Echantillon | Rendement | Echantillon | Rendement |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ST 1 | 0,47 | H 1 | 0,24 | BK 1 | 0,53 | G 1 | 0,53 |
| ST 2 | 0,73 | H 2 | 0,34 | BK 2 | 0,50 | G 2 | 1,11 |
| ST 3 | 0,91 | H 3 | 0,24 | BK 3 | 0,54 | G 3 | 0,70 |
| ST 4 | 0,19 | H 4 | 0,17 | BK 4 | 0,75 | G 4 | 0,61 |
| ST 5 | 0,42 | H 5 | 0,23 | BK 5 | 0,63 | G 5 | 0,96 |
| **Moy ± ET** | 0,54±0,28 | **Moy ± ET** | 0,24±0,06 | **Moy ± ET** | 0,59±0,10 | **Moy ± ET** | 0,78±0,24 |
| **Altitude (m)** | **497** | **Altitude (m)** | **165** | **Altitude (m)** | **408** | **Altitude (m)** | **42** |
| | | | | | | | |
| **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** | **Echantillon** | **Rendement** |
| Sab 1 | 0,91 | AK 1 | 0,60 | OM 1 | 0,6 | S1 | 1,13 |
| Sab 2 | 0,44 | AK 2 | 0,86 | OM 2 | 0,6 | S2 | 1,07 |
| Sab 3 | 0,27 | AK 3 | 0,64 | OM 3 | 0,64 | S3 | 0,40 |
| Sab 4 | 0,23 | AK 4 | 0,50 | OM 4 | 0,40 | S4 | 0,26 |
| Sab 5 | 0,29 | AK 5 | 0,33 | OM 5 | 0,40 | S5 | 0,29 |
| **Moy ± ET** | 0,43±0,28 | **Moy ± ET** | 0,59±0,19 | **Moy ± ET** | 0,53±0,12 | **Moy ± ET** | 0,63±0,43 |
| **Altitude (m)** | **495** | **Altitude (m)** | **779** | **Altitude (m)** | **768** | **Altitude (m)** | **1210** |

ST: Souk Tlata, H : Honaïne, BK : Beni Khalled, G : Ghazaouet, Sab : Sabra, AK : Aïn Kebira, OM : Ouled Mimoun, S : Sebdou, Moy : Moyenne, ET : Ecart-Type.

### I.2.2. Etude de la composition et de la variabilité chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata*

Afin de contribuer à la caractérisation de l'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* poussant en Algérie (région de Tlemcen), nous avons isolés et analysés 40 échantillons provenant de huit stations de la région de Tlemcen (nord-ouest d'Algérie).

- Nous avons procédé, en premier lieu, à une analyse détaillée de six échantillons choisis en fonction de leur profil chromatographique, en appliquant une CPG(Ir), RMN $^{13}C$ et une CPG-SM ;
- Ensuite, pour mettre en évidence l'existence d'une éventuelle variabilité chimique, 34 autres échantillons d'huile essentielle ont été préparés et analysés par CPG(Ir). Les résultats obtenus ont ensuite été soumis à un traitement statistique.

### I.2.2.1. Analyse détaillée de six échantillons d'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata*

Nous avons analysé six échantillons d'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* de la région de Tlemcen (Sab6, Sab10, AK12, G40, H16, S30), par combinaison de trois techniques CPG(Ir), RMN $^{13}C$ et CPG-SM. La caractérisation chimique de ces huiles essentielles a été réalisée par RMN $^{13}C$ sans séparation préalable des constituants. Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celle des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. L'interrogation de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire, nous a permis d'identifier 25 composés qui représentent un pourcentage de l'ordre de 92,4% à 97,1% (**Tableau 11**). Les constituants identifiés par RMN $^{13}C$, sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés. Nous préciserons que pour chaque composé tous les signaux des carbones attendus sont observés, à l'exception de certains signaux des carbones quaternaires de composés minoritaires.

L'application de la CPG-SM, pour l'analyse de cet échantillon, nous a permis d'identifier 13 autres composés minoritaires (**Tableau 11**) de teneurs inférieures à 0,5% qui ne peuvent pas être identifiés par RMN $^{13}C$. Une fois identifiés, ces composés sont aisément repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire, ce qui permet leur quantification.

Au total, 38 composés ont été identifiés, représentant 94,1-99,0% de la composition totale (**Tableau 11**).

Les six échantillons sont largement dominés par des monoterpènes et principalement des monoterpènes hydrocarbonés suivis par des monoterpènes oxygénés (**Tableau 11**), avec de l'α-pinène comme composé majoritaire (47,1-73,6%), suivi de limonène (6,9-21,6%) et de myrcène (1,7-11,6%). Certains sesquiterpènes sont présents en quantité appréciables, à savoir : *(E)*-β-caryophyllène (0,3-6,3%), γ-cadinène (0,1-3,4%), germacrène D (0,1-3,2%), oxyde de caryophyllène (tr-2,7%), α-humulène (0,1-1,7%), sibérène (0,0-1,7%).

Enfin, nous avons pu identifier par CPG-SM, deux diterpènes : *(Z)*-biformène (tr-0,8%) et *(E)*-biformène (tr-0,6%) dont l'identification a été confirmée par RMN $^{13}C$. Ces composés sont décrits, à notre connaissance, pour la première fois dans l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*.

**Tableau 11 : Composition chimique des six échantillons d'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata***

| Composés[a] | IRa[b] | IRp[c] | Sab6 | Sab10 | AK12 | G40 | H16 | S30 | Mode d'identification |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tricyclène | 918 | 1016 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | IR, SM |
| α-Pinène | 929 | 1016 | 62,4 | 47,1 | 73,6 | 55,0 | 55,9 | 68,4 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Camphène | 941 | 1063 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | IR, SM |
| Sabinène | 962 | 1121 | 0,8 | 0,4 | 0,7 | 0,8 | 0,5 | 0,5 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| β-Pinène | 968 | 1110 | 2,0 | 1,6 | 1,8 | 1,3 | 1,9 | 1,7 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Myrcène | 978 | 1159 | 11,6 | 6,1 | 4,8 | 2,1 | 4,2 | 1,7 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| δ-3-Carène | 1003 | 1147 | 0,1 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | IR, SM |
| α-Terpinène | 1007 | 1179 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | IR, SM |
| *p*-Cymène | 1009 | 1269 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | IR, SM |
| Limonène* | 1019 | 1200 | 9,2 | 6,9 | 8,7 | 21,6 | 11,5 | 7,5 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| β-Phellandrène* | 1019 | 1209 | 0,6 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| γ-Terpinène | 1046 | 1243 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | IR, SM |
| Terpinolène | 1076 | 1280 | 0,9 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Campholènal | 1102 | 1488 | Tr | 0,4 | 0,5 | 1,1 | 0,8 | 2,4 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Camphre | 1118 | 1514 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | IR, SM |
| *trans*-Pinocarvéol | 1121 | 1651 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | 0,5 | 1,2 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| *trans*-Verbénol | 1125 | 1674 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 1,0 | 0,1 | 0,5 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Bornéol | 1146 | 1696 | 0,2 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | Tr | IR, SM |
| Terpinén-4-ol | 1158 | 1598 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 0,5 | 0,3 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Terpinéol | 1169 | 1696 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | IR, SM |
| Perrilaldehyde | 1242 | 1784 | 0,1 | 0,2 | Tr | 0,1 | 1,0 | 0,1 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Acétate de bornyle | 1266 | 1576 | 1,1 | 2,4 | 0,8 | 1,1 | 2,5 | 2,0 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Acétate d'α-terpinyle | 1329 | 1692 | 1,4 | 2,1 | 0,8 | 2,0 | 3,0 | 2,3 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Copaéne | 1372 | 1486 | 0,2 | 1,1 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | - | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| β-Elemène | 1384 | 1585 | 0,1 | 0,2 | - | - | 0,2 | - | IR, SM |
| Sibérène | 1396 | 1545 | 0,2 | 1,7 | 0,8 | 0,1 | 0,3 | - | IR, SM |
| *(E)*-β-Caryophyllène | 1413 | 1591 | 1,3 | 6,3 | 0,3 | 2,6 | 4,0 | 1,1 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Humulène | 1446 | 1663 | 0,4 | 1,7 | 0,1 | 0,7 | 1,1 | 0,5 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| γ-Muurolène | 1466 | 1681 | 0,1 | 0,2 | Tr | - | Tr | - | IR, SM |
| Germacrène D | 1472 | 1702 | 3,2 | 6,1 | 0,7 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| γ-Cadinène | 1502 | 1752 | 1,1 | 3,4 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| δ-Cadinène | 1510 | 1750 | 0,2 | 0,8 | 0,2 | Tr | 0,1 | 0,1 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| α-Cadinène | 1526 | 1781 | Tr | 0,2 | Tr | - | - | - | IR, SM |
| Oxyde de caryophyllène | 1565 | 1974 | Tr | 1,8 | Tr | 1,6 | 2,7 | 0,6 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| *epi*-Cubénol | 1611 | 2056 | 0,1 | 1,0 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | - | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| τ-Cadinol | 1621 | 2162 | 0,1 | 0,6 | 0,1 | - | Tr | - | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| *(Z)*-Biformène | 1971 | 2312 | Tr | 0,8 | Tr | 0,1 | 0,2 | 0,2 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| *(E)*-Biformène | 1997 | 2357 | Tr | 0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | IR, SM, RMN $^{13}C$ |
| Total (%) | | | 99,0 | 96,5 | 98,3 | 95,7 | 95,0 | 94,1 | |

[a)] L'ordre d'élution et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; [b)] IRa: indices de rétention sur colonne apolaire (BP-1) ; [c)] IRp : indices de rétention sur colonne polaire (BP-20) ; Tr : Trace ; RMN $^{13}C$ : Composés identifiés par RMN au moins dans un des échantillons.

### I.2.2.2. Variabilité chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata*

Dans le but de mettre en évidence une homogénéité ou une éventuelle variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de cônes de *Tetraclinis articulata*, nous avons étudié 34 autres échantillons. Le prélèvement a été réalisé dans huit stations de la région de Tlemcen, cités précédemment. L'ensemble des échantillons ont été analysés par CPG (Ir) sur deux colonnes de polarité différente.

Au total, nous identifions 38 composés, les mêmes que ceux déjà identifiés lors de l'étude présentée dans le paragraphe précédent, représentant de 91,4-99,0% de la composition chimique globale.

Ces huiles essentielles sont globalement dominées par les monoterpènes, suivi de sesquiterpènes. Toutefois, nous avons observé une variation quantitative au niveau des composés monoterpèniques oléfiniques majoritaires, à savoir : l'α-pinène (47,1-73,6%) et le limonène (6,5-21,9%) (**Tableau 12**). Le myrcène précédemment décrit dans les six échantillons dont son pourcentage avoisine 11,6% est également présent en quantité appréciable. De même, deux sesquiterpènes hydrocarbonés : *(E)*-β-caryophyllène et germacrène D sont aussi identifiés comme composés majoritaires dans l'huile essentielle des cônes de thuya. Enfin, les deux diterpènes, *(Z)* et *(E)*-biformène, composés minoritaires, sont également présents dans la quasi-totalité des échantillons analysés. Nous avons rapportés dans le tableau 12, les principaux composants.

**Tableau 12 : Variabilité chimique d'huile essentielle des cônes : les principaux composants dans les 40 échantillons**

| Constituants | Groupe I (14 échantillons) | | | | Groupe II (26 échantillons) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Sous-groupe IIA (7 échantillons) | | | | Sous-groupe IIB (19 échantillons) | | | |
| | **Moy** | **ET** | **Min** | **Max** | **Moy** | **ET** | **Min** | **Max** | **Moy** | **ET** | **Min** | **Max** |
| α-Pinène | **69,7** | **2,8** | **64,0** | **73,6** | **51,9** | **3,3** | **47,1** | **56,0** | **61,6** | **2,3** | **55,9** | **65,7** |
| β-Pinène | 1,8 | 0,2 | 1,5 | 2,5 | 1,5 | 0,1 | 1,3 | 1,7 | 1,7 | 0,2 | 1,3 | 2,0 |
| Myrcène | **3,9** | **1,2** | **1,7** | **5,6** | **4,4** | **2,8** | **2,1** | **10,1** | **5,2** | **2,5** | **2,9** | **11,6** |
| Limonène | **10,6** | **2,6** | **7,3** | **15,4** | **17,1** | **5,0** | **6,9** | **21,9** | **13,9** | **4,4** | **6,5** | **20,6** |
| Terpinolène | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 1,3 | 0,7 | 0,2 | 0,4 | 1,0 | 0,6 | 0,2 | 0,2 | 0,9 |
| α-Campholénal | 0,7 | 0,7 | 0,1 | 2,2 | 0,7 | 0,5 | 0,2 | 1,6 | 0,5 | 0,3 | 0,0 | 1,1 |
| *trans*-Pinocarvéol | 0,4 | 0,4 | 0,0 | 1,2 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,0 | 0,6 |
| Acétate de bornyle | 1,2 | 0,4 | 0,8 | 2,0 | 1,7 | 0,4 | 1,1 | 2,4 | 1,5 | 0,5 | 0,7 | 2,5 |
| Acétate d'α-terpinyle | 1,0 | 0,6 | 0,0 | 2,3 | 2,6 | 0,8 | 1,7 | 4,1 | 1,7 | 0,6 | 0,8 | 3,0 |
| α-Copaéne | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,8 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 1,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,5 |
| Sibérène | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 1,3 | 0,7 | 0,5 | 0,1 | 1,7 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,8 |
| *(E)*-β-Caryophyllène | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 1,1 | 2,9 | 2,1 | 0,3 | 6,3 | 1,7 | 1,6 | 0,1 | 5,7 |
| α-Humulène | 0,3 | 0,4 | 0,0 | 1,6 | 0,7 | 0,6 | 0,0 | 1,7 | 0,5 | 0,5 | 0,0 | 1,9 |
| Germacrène D | 1,2 | 0,5 | 0,4 | 2,2 | 2,5 | 2,0 | 0,1 | 6,1 | 1,6 | 0,7 | 0,4 | 3,2 |
| γ-Cadinène | 0,6 | 0,4 | 0,1 | 1,3 | 1,0 | 1,1 | 0,0 | 3,4 | 1,0 | 0,6 | 0,2 | 2,0 |
| Oxyde de caryophyllène | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,7 | 2,2 | 3,5 | 0,0 | 10,0 | 0,5 | 0,7 | 0,0 | 2,7 |
| *epi*-Cubénol | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | 1,0 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,6 |

Moy : Pourcentage moyen ; ET : écart type ; Min : Pourcentage moyens minimum ;
Max : Pourcentage moyens maximum.

Ayant observé des variations importantes des teneurs des trois composés majoritaires (l'α-pinène, le limonène et le myrcène) au sein de l'échantillonnage, nous avons soumis les résultats à une analyse en composantes principales (ACP) (**Figure 18**) et une classification hiérarchique ascendante (CHA, dendrogramme : **Figure 19**) pour laquelle le plan défini par les deux premiers axes décrit 89,5% du total de la variance des populations. Cette analyse statistique a permis de définir deux principaux groupes d'huiles essentielles de thuya. En parallèle, le groupe II a été divisé en deux sous-groupes IIA et IIB (**Tableau 12**).

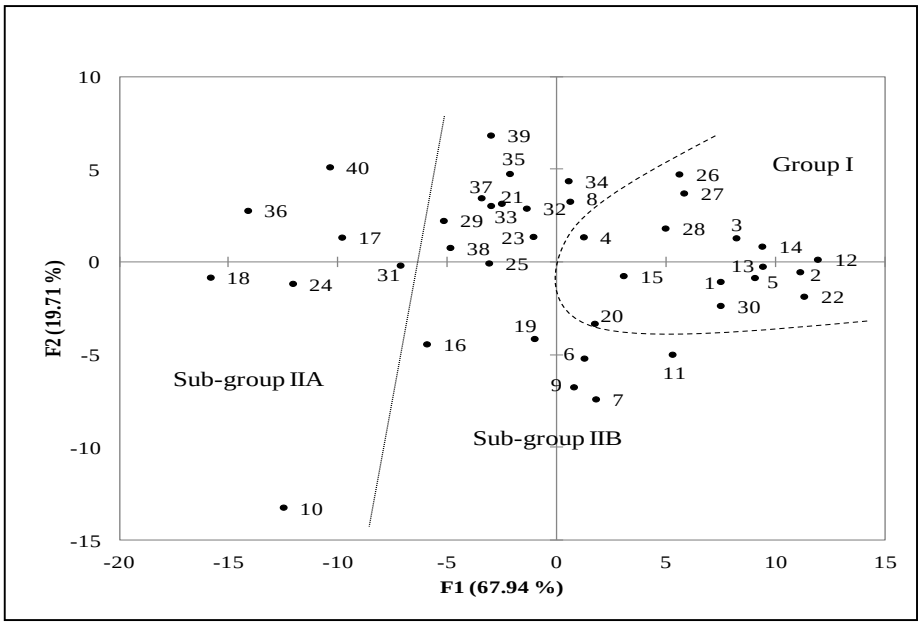



**Figure 18 : Analyse en composantes principales (ACP) de 40 échantillons d'huile essentielle des cônes *de Tetraclinis articulata***

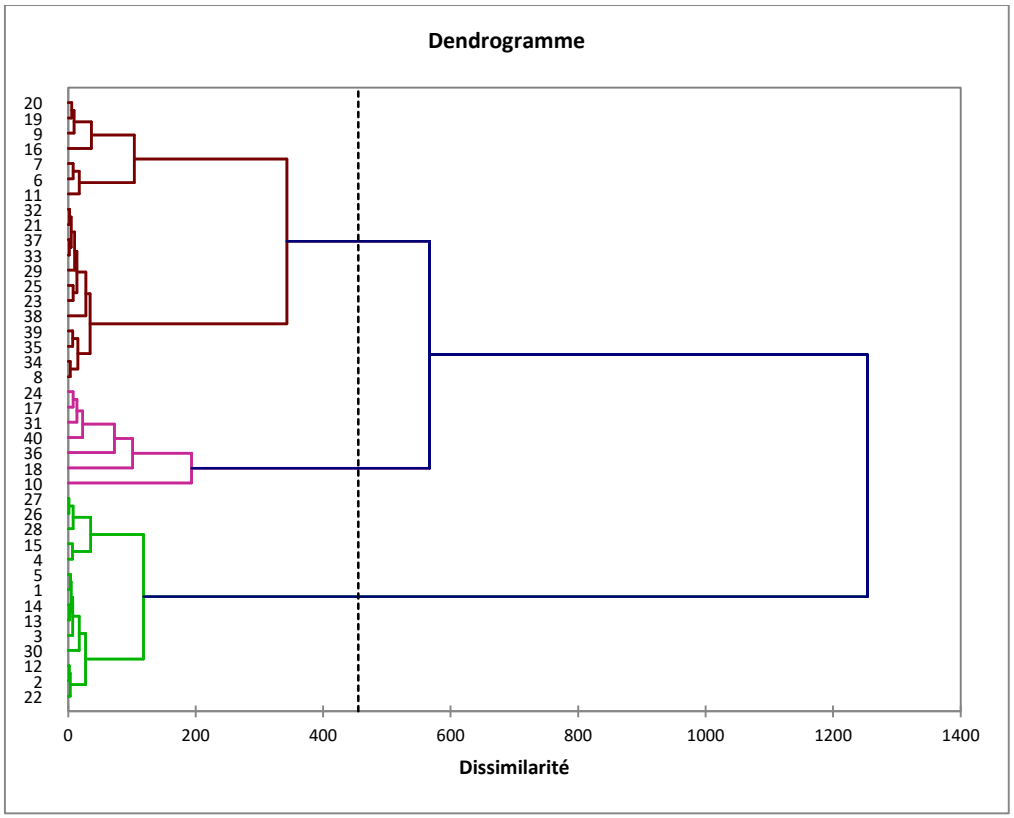



**Figure 19 : Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse de Cluster de 40 échantillons d'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata***

-**Le groupe I** constitué de 14 échantillons, est largement dominé par l'α-pinène (M : 69,7% ; ET : 2,8), suivi de limonène (M : 10,6% ; ET : 2,6). D'autres composants sont présents en faibles teneurs (pourcentage moyen inférieur à 2%), à l'exception du myrcène (M : 3,9% ; ET : 1,2).

- **Le groupe II** rassemble 26 échantillons avec également l'α-pinène comme composé majoritaire, mais en proportion moins importante que le groupe I. En effet, ce groupe est subdivisé en deux sous-groupes :

- **Le sous-groupe IIA** (7 des 40 échantillons) est caractérisé par la prédominance de l'α-pinène (M : 51,9% ; ET : 3,3) suivi de limonène (M : 17,1% ; ET : 5,0). D'autres composés sont également présents en quantité appréciable : acétate d'α-terpinyle (M : 2,6% ; ET : 0,8), *(E)*-β-caryophyllène (M : 2,9% ; ET : 2,1) et germacrène D (M : 2,5% ; ET : 2,0).
- **Le sous-groupe IIB** contient 19 échantillons. Les composés majoritaires sont également l'α-pinène (M : 61,6% ; ET : 2,3) et le limonène (M : 13,9% ; ET : 4,4). En fonction des pourcentages, ce sous-groupe IIB se situe entre le groupe I et le sous-groupe IIA. On note aussi la même observation concernant les monoterpènes oxygénés et les sesquiterpènes hydrocarbonés cités précédemment (**Tableau 12**).

Ainsi, l'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* est largement dominée par l'α-pinène, suivi de limonène. Cependant, en se basant sur les quantités de ces deux constituants, elle présente une variabilité chimique quantitative avec trois compositions différentes. Ces dernières sont retrouvées dans toutes les stations de récolte. La variabilité chimique de thuya semble donc être indépendante des conditions pédoclimatiques. Par ailleurs, ce travail est la première étude réalisée sur l'huile essentielle des cônes de thuya avec un échantillonnage important (40 échantillons) dans une région bien définie.

A notre connaissance, seulement trois études ont été consacrées à l'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata*. La comparaison de nos résultats avec les données de la littérature (**Tableau 13**) révèle que la composition chimique des échantillons du groupe I est proche de celles rapportées pour les huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* de Malte et d'Algérie (Tipaza à 70 Km d'Alger) **(Buhagiar *et al.*, 2000 ; Chikhoune *et al.*, 2013)**. Néanmoins dans l'échantillon de Malte, **Buhagiar *et al.***, mettent en évidence une teneur appréciable en α-terpinéol (4,9%). La composition chimique des échantillons du sous-groupe IIA est similaire à celle de l'échantillon de cônes récoltées en Algérie, à la station Hammam Melouane (à 40 Km d'Alger) **(Chikhoune *et al.*, 2013)**. Enfin, la composition de nos

échantillons diffère radicalement de celle d'un échantillon de provenance de Tunisie, décrite par **Tékaya-Karoui *et al*.** en **2007**. En effet, les composés majoritaires sont : *p*-cymène-8-ol (10,4%), β-phellandrène (8,1%), bornéol (6,9%), trans-pinocarvéol (6,1%), carvone (5,3%), acétate de fenchyle (5,1%), nérol (3,9%) et α-terpinéol (3,2%) **(Tékaya-Karoui *et al.*, 2007)**.

**Tableau 13 : Composés majoritaires dans l'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* des différentes régions selon la littérature**

| **Composés** | **Buhagiar *et al.*, (2000) (Malte)** | **Tékaya-Karoui *et al.*, (2007) (Tunisie)** | **Chikhoune *et al.*, (2013) (Algérie)** | | **Boussaïd *et al.*, (2016) Tlemcen (Algérie)** |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **Hammam Melouane** | **Tipaza** | |
| α-Pinène | 68,2% | …… | 57,5% | 75,0% | 47,1-73,6% |
| Limonène | 16,6% | …… | 20,9% | 10,6% | 6,5-21,9% |
| Myrcène | 2,0% (β-) | …… | 3,6% (β-) | 10,6% (β-) | 1,7-11,6% |
| α- Terpinéol | 4,9% | 3,2% | …… | …… | Tr-0,3% |
| *trans*-Pinocarvéol | …… | 6,1% | …… | …… | 0,1-1,2% |
| *p*-Cymène-8-ol | …… | 10,4% | …… | …… | …… |
| Acétate de fenchyle | …… | 5,1% | …… | …… | …… |
| β-Phellandrène | …… | 8,1% | …… | …… | 0,2-0,6% |
| Carvone | …… | 5,3% | …… | …… | …… |
| Bornéol | …… | 6,9% | …… | …… | 0,0-0,2% |
| Nérol | …… | 3,9% | …… | …… | …… |

## II. Etude des activités biologiques des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata*

Cette partie est divisée en deux axes : le premier est consacré à l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des parties aériennes (3 types chimiques) de thuya. Dans le deuxième axe, nous avons déterminé l'activité antioxydante des huiles essentielles des parties aériennes (3 types chimiques) et des cônes (12 échantillons), choisies en fonction de leur profil chromatographique.

Pour les huiles essentielles des parties aériennes, nous avons mélangé les échantillons appartenant au même chémotype pour pouvoir réaliser les activités biologiques.

### II.1. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata*

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de thuya a été testé vis-à-vis de six bactéries, deux levures et deux champignons filamenteux en appliquant la méthode de diffusion sur disque, et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) en utilisant la méthode de contact direct en milieu gélosé.

Dans le tableau 14, nous rapportons les compositions chimiques des 3 échantillons testés.

**Tableau 14 : Composés majoritaires dans les huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* utilisées pour les activités biologiques**

| Composés majoritaires (en %) | GI Camphre | GIIA α-Pinène | GIIB Acétate de bornyle |
|---|---|---|---|
| **α-Pinène** | 18,0 | **50,2** | 19,0 |
| **Camphre** | **33,7** | 11,2 | 8,4 |
| **Acétate de bornyle** | 13,5 | 13,5 | **42,5** |
| Myrcène | 2,6 | 2,3 | 2,8 |
| Limonène | 6,4 | 4,7 | 7,9 |
| Bornéol | 4,0 | 3,4 | 2,9 |
| *(E)*-β-Caryophyllène | 1,3 | 4,4 | 0,8 |
| Germacrène D | 0,4 | 0,9 | 0,9 |

#### II.1.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* et l'antibiorésistance de chaque souche vis-à-vis des contrôles positifs, sont donnés dans le tableau 15.

Comme cela est souvent indiqué dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 15 mm

**(Rossi, 2003)**. Ainsi, les huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* appartenant aux trois types chimiques différents, agissent de façon très active sur les deux souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* **(Photo 5)** ainsi que sur la souche fongique filamenteuse, à savoir : *Aspergillus fumigatus*, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 20 et 38,5 mm. Cependant, l'huile essentielle à camphre s'est avérée la plus intéressante. En revanche, l'ensemble des huiles essentielles testées sont inactives vis-à-vis des souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* qui se révèlent très résistantes. Par ailleurs, les autres souches microbiennes se sont montrées plus ou moins sensibles à tous ces huiles essentielles, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 9,3 et 19 mm **(Photo 6 et 7)**.

Ces résultats confirment ceux de **Chikhoune *et al*. (2013)** qui rapportent une faible activité des huiles essentielles des feuilles de thuya vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, avec des zones d'inhibition variant entre 7 et 11 mm. Ils avancent également une importante sensibilité de *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition variant entre 18 et 22 mm. Ces huiles essentielles contiennent une teneur élevée en acétate de bornyle, avec des pourcentages de 40,2 et 59,2% dans deux échantillons récoltés dans deux stations différentes.

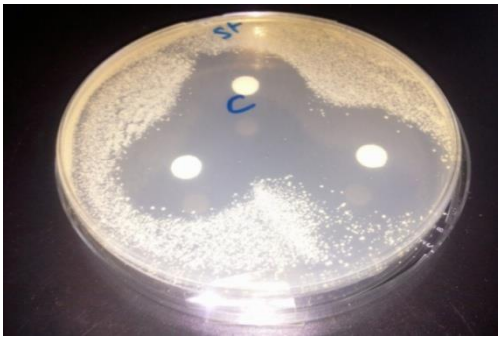



**Photo 5 : Inhibition de *Staphylococcus aureus* par le camphre**

**Photo 6 : inhibition de *Staphylococcus aureus* par l'α-pinène**

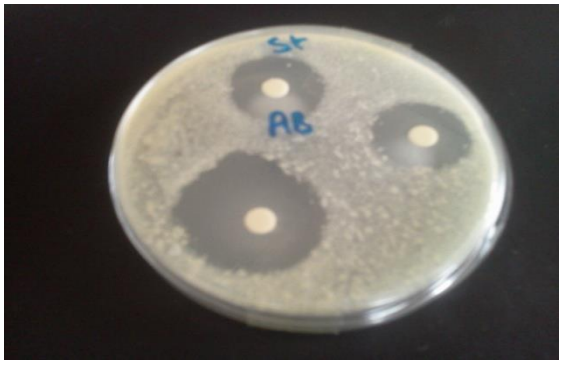



**Photo 7 : Inhibition de *Staphylococcus aureus* par l'acétate de bornyle**

**Tableau 15 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des trois huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* relatives aux souches microbiennes selon la méthode de disque**

| | **Antibiotiques** | | | | | **Antifongique** | | **Huile essentielle (15 µL/mL)** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Souches microbiennes** | **CIP** (10 µg) | **VA** (30 µg) | **OX** (5 µg) | **PEN** (6 µg) | **AM** (10 µg) | **Ny** (30 µg) | **FLU** (25 µg) | **Acétate de bornyle** | **α-pinène** | **Camphre** | **DMSO** |
| *Escherichia coli* | 28,5±0,7 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 23,0±0,0 | -------- | -------- | 6,0±0,0 | 11,3±0,6 | 10,0±0,0 | 6,0 |
| *Enterococcus faecalis* | 29,0±1,4 | 22,0±2,8 | 11,5±7,8 | 16,0±8,5 | 6,0±0,0 | -------- | -------- | 9,3±0,6 | 15,3±1,2 | 11,7±0,6 | 6,0 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 29,0±1,0 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | -------- | -------- | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0 |
| *Klebsiella pneumoniae* | 23,0±1,4 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | -------- | -------- | -------- | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0±0,0 | 6,0 |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 | 39,0±4,0 | 17,5±2,1 | 16,0±0,0 | 34,0±0,0 | 32,5±2,1 | -------- | -------- | **24,6±0,9** | **24,0±1,4** | **38,5±8,2** | 6,0 |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 | 21,0±0,0 | 17,0±0,0 | 20,0±0,0 | -------- | 37,0±0,0 | -------- | -------- | **20,0±0,0** | **20,0±1,7** | **24,0±4,2** | 6,0 |
| *Candida albicans CIP* | -------- | -------- | -------- | -------- | -------- | 20,0±0,0 | 8,0±0,0 | 11,7±1,2 | 11,3±0,6 | 19,0±1,0 | 6,0 |
| *Candida albicans* | -------- | -------- | -------- | -------- | -------- | 16,0±0,0 | 6,0±0,0 | 12,0±0,0 | 15,0±0,0 | 12,7±1,2 | 6,0 |
| *Aspergillus flavus* | -------- | -------- | -------- | -------- | -------- | 22,3±0,6 | AC | 12,7±2,1 | 8,3±0,6 | 13,0±1,7 | 6,0 |
| *Aspergillus fumigatus* | -------- | -------- | -------- | -------- | -------- | 33,7±1,2 | 6,0±0,0 | **20,0±5,3** | **21,3±4,2** | **AC** | 6,0 |

**Contrôles positifs : CIP :** Ciprofloxacine, **VA :** Vancomycine, **OX :** Oxacilline, **PEN :** Pénicilline, **AM :** Amoxicilline, **FLU :** Fluconazole, **Ny :** Nystatine, **DMSO :** Diméthylsulfoxyde (**contrôle négatif**), **AC :** Absence de croissance, --------: Non testé

**II.1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode de contact direct en milieu gélosé**

L'efficacité de l'huile essentielle sur les souches microbiennes sensibles a été déterminée par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMIs) par la méthode de contact direct en milieu gélosé. Pour cela, nous avons sélectionné seulement trois souches microbiennes qui possèdent une forte sensibilité pour les trois huiles testés, à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus.* Les résultats sont rapportés dans le tableau 16.

**Tableau 16 : Concentrations minimales inhibitrices (CMIs) en huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* relatives aux souches sensibles**

| Micro-organismes testés | Huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (µL/mL) | | |
|---|---|---|---|
| | Acétate de bornyle | α-pinène | Camphre |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 | 4,0 | 6,0 | 3,0 |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 | 4,0 | 6,0 | 3,0 |
| *Aspergillus flavus* | > 2,0 | > 2,0 | > 2,0 |
| *Aspergillus fumigatus* | 2 | ≤ 2,0 | ≤ 1,0 |

**Teixeira et *al.* en 2005**, avancent que toute huile essentielle qui présente des CMIs inférieurs à 2000 µg/mL, est considérée avoir un potentiel antimicrobien.

Une interprétation globale des résultats montre que les valeurs des CMls concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition, les huiles essentielles ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMIs sur les souches correspondantes.

C'est le cas de l'huile essentielle à camphre qui s'est révélée particulièrement très efficace contre *Aspergillus fumigatus*, avec une CMI très faible, inférieure ou égale à 1,0 µL/mL. Il est à noter que cette huile essentielle contient également une quantité appréciable en acétate de bornyle, avec un pourcentage de 13,5%. En effet, l'huile essentielle qui est riche en ce composé a montré aussi une bonne activité en particulier vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus*, avec une CMI de l'ordre de 2 µL/mL. Ainsi, bien que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle soit attribuée principalement à son composé majoritaire **(Ipek *et al.*, 2005)**, l'effet synergique ou antagoniste de chacun de ses constituants présents en faible teneur est également considéré **(Chang *et al.*, 2001 ; Daferera *et al.*, 2003)**. Par comparaison

de nos résultats avec ceux d'**Abi-Ayad *et al.*** en **2013** qui ont déterminé l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* (contenant 52,1% d'acétate de bornyle), sur plusieurs souches filamenteuses, notamment *Aspergillus flavus* et *A. niger*, nous avons constaté que nos huiles essentielles sont plus actives. En effet, ces auteurs ont noté une activité antifongique faible, avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 64,44 et 61,63%, respectivement à une concentration de 15 µL/mL. Ceci est du probablement à la présence en quantités appréciables du limonène (4,7-7,9% contre 0,6%) dans nos échantillons. En effet, le pouvoir antimicrobien du limonène a été démontré sur plusieurs souches bactériennes, notamment : *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*, avec des CMIs variant entre 4 et 125 µg/mL **(Erdoğan Orhan *et al.*, 2012 ; Dai *et al.*, 2013)**.

En outre, nous avons constaté une activité modérée des huiles essentielles à camphre et à acétate de bornyle vis-à-vis des deux souches de *Staphylococcus aureus*, avec des CMIs variant entre 3 et 4 µL/mL **(Photo 8 et 9)**. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Lemos *et al*. (2015)** qui avancent que les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* qui contiennent entre 24,4 et 35,9% de camphre, présentent une importante activité contre *S. aureus* avec des CMIs variant entre 0,5 et 2,0 µL/mL. Ils soulignent également que l'huile essentielle la plus riche en camphre est la plus efficace. Ceci a déjà été confirmé par **Magiatis *et al.*** en **2002** qui ont travaillé sur plusieurs espèces d'*Achillea* présentant du camphre comme composé majoritaire.

Par ailleurs, le pouvoir antimicrobien de l'acétate de bornyle et du camphre a été démontré par plusieurs travaux. En effet, **Bougatsos *et al.*** en **2004**, **Vagionas *et al.*** en **2007** ainsi que **Runyoro *et al.*** en **2010**, rapportent des CMIs variant entre 1,75 et 4,88 mg/mL pour l'acétate de bornyle et entre 1,33 et 3,24 mg/mL pour le camphre contre plusieurs souches microbiennes. En revanche **Erdoğan Orhan *et al.*** en **2012** avancent des CMIs très faibles variant entre 4 et 16 µg/mL pour l'acétate de bornyle. D'autre part, les esters et surtout l'acétate de bornyle (30,74%), peuvent aussi participer à l'effet antibactérien et antifongique. En effet, en se basant sur les travaux de **Tzakou *et al.*** en **1998**, les huiles essentielles de deux chémotypes de *Thymus longicaulis* riches en acétate de géranyle pour le premier et en acétate d'α-terpènyle pour le deuxième, possèdent une grande activité antimicrobienne.

En outre, **Soković et van Griensven** en **2006** ont testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de plusieurs espèces de Lamiacées ainsi que leurs composés majoritaires. Ils ont montré que le camphre est très efficace contre plusieurs micro-organismes qui contaminent les cultures des champignons de Paris avec des CMIs très faibles variant entre

1,5 et 2,5 µL/mL. Les travaux de **Juteau *et al.*** en **2002** et de **Shunying *et al.*** en **2005** ont déjà avancé que le camphre est un bon agent antimicrobien. De même, **Felice *et al*. (2004)** ont conclu que le camphre et ses dérivés peuvent être considérés comme des constituants antimicrobiens lors de l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'*Achillea teretifolia*. De même, **Àlvarez *et al.*** en **2012**, rapportent que le (-)-5,6-déhydrocamphre présente une activité antifongique contre les dermatophytes, particulièrement *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* et *T. mentagrophytes*, avec des CMIs très faibles variant entre 125 et 250 µg/mL.

Nous avons constaté également que parmi les bactéries testées, les deux espèces de *Staphylococcus aureus* se sont montrées les plus sensibles à l'ensemble des huiles essentielles testées. En effet, la plupart des études rapportent que les bactéries à Gram (+) sont généralement plus sensibles que celle à Gram (-) **(Burt, 2004 ; Deba *et al.*, 2008 ; Nedorostova *et al.*, 2009)**, car la paroi des bactéries à Gram négatif est constituée essentiellement de lipopolysaccharides qui limitent la diffusion des composés hydrophobes et évitent l'accumulation des huiles essentielles dans la membrane cellulaire **(Bezić *et al.*, 2003)**.

Nos résultats sont également en accord avec ceux de **Bourkhiss *et al.*** en **(2007b)**. En effet, ces auteurs montrent une activité inhibitrice importante, *in vitro*, vis-à-vis de quatre bactéries et deux champignons testés. *Staphylococcus aureus* a montré la plus grande sensibilité, inhibée à une concentration de 1/5000 (v/v). Par contre, *Aspergillus niger* est inhibé à une concentration de l'ordre de (1/500 (v/v). Les composés majoritaires sont l'acétate de bornyle (30,7%), l'α-pinène (23,5%), suivi par le limonène (23,3%) et le camphre (17,3%).

De même, **Chikhoune *et al*. (2013)** ont noté une forte activité des huiles essentielles des feuilles de thuya prélevées dans deux stations en Algérie, vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, avec des CMIs très faibles variant entre 0,2 µL/mL et 0,4 µL/mL. Ces huiles essentielles sont également très riches en acétate de bornyle, avec des pourcentages de 40,2 et 59,2%.

Par contre, **Abi-Ayad *et al*. (2011, 2013)** avancent des CMIs plus importante vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et des champignons filamenteux. En effet, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont inhibées à des CMIs variant entre 7,5 et 10 µL/mL. Concernant les souches fongiques, la plus importante activité a été rapportée contre les espèces de *Fusarium sp.*, avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 94 et 100% au bout de 6 jours, à une concentration de 15 et 20 µL/mL, respectivement, suivi par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* inhibé respectivement à 64,44 et à 61,63% à une concentration de 15 µL/mL. La composition chimique de cette huile essentielle est nettement dominée par

l'acétate de bornyle (52,1%). Il a été démontré que l'acétate de bornyle présente une activité antimicrobienne modérée **(Duke *et al.*, 2001)**. En revanche, **Bouayad Alam *et al.* (2014)** ont constaté que l'huile essentielle des parties aériennes de *Tetraclinis articulata* est très active contre cinq mycètes (*F. oxysporum*, *A. solani*, *A. niger*, *penicillium* sp.1 et *penicillium* sp.2) avec des pourcentages d'inhibition variant entre 57,77% et 84,44% à une très faible concentration de l'ordre de 5 µg/mL.

En outre, nous avons constaté que l'huile essentielle à α-pinène présente une faible activité contre toutes les souches microbiennes testées **(Photo 10)**. En effet, il a été rapporté que l'α- et le β-pinène présente une très faible activité contre un panel de microorganismes. Les valeurs de CMIs varient entre 7,5 et 20,0 mg/mL contre *S. aureus*, *E. coli* et *E. faecalis* **(Dorman et Deans, 2000 ; Sonboli *et al.*, 2006 ; Jung, 2009 ; Leite *et al.*, 2007)**. De même, l'huile essentielle de *Pinus roxburghii* qui est riche en α-pinène (60,8%) a montré une faible activité antibactérienne contre *S. aureus*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*, avec une CMI, de l'ordre de 12,8 mg/mL **(Quadir et Shah, 2014)**. Parallèlement, l'huile essentielle de *Pinus nigra* ssp. *pallasiana* qui contient de l'α-pinène (42,3%) comme composé majoritaire exercice également une faible activité vis-à-vis des bactéries citées précédemment, avec des CMIs variant entre 10 et 20 mg/mL **(Šarac *et al.*, 2014)**. Il en est de même pour les travaux d'**Angioni *et al.*** en **2003**. Ces auteurs ont testé des huiles essentielles de plusieurs espèces végétales, à savoir : *Juniperus oxycedrus*, *J. communis* et *J. phoenicea* qui sont nettement dominée par l'α-pinène, avec des pourcentages variant entre 48,9 et 86,0% contre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*. Ces micro-organismes se sont révélés très résistants avec des CMIs et des CMBs supérieures à 900 µg/mL. Ils rapportent également les mêmes CMIs et CMBs de l'α-pinène pur contre ces mêmes souches microbiennes. En revanche, les travaux réalisés par **Mohan *et al.*** en **2012** montrent que l'huile essentielle de *Murraya koenigii* riche en α-pinène (39,9%), possède une bonne activité vis-à-vis de *S. aureus* avec une valeur de CMI de 5 µg/mL. Il est à noter que cette huile essentielle contient également le trans-caryophyllène en quantité appréciable, soit (9,02%). De même, **Stojkovic *et al.*** en **2011** ont testé l'activité antimicrobienne de l'α-pinène à 98% de pureté contre *S. aureus*, *E. coli* et *A. flavus*. Ces auteurs rapportent également une bonne activité de ce composé avec des CMIs variant de 6 à 8 µg/mL. Parallèlement, **Kivrak *et al.*** en **2009** avancent une bonne activité de l'huile essentielle de *Salvia potentillifolia* (qui contient 29,30% d'α-pinène et 14,85% de β-pinène) et de l'α-pinène contre *E. coli*, *S. aureus* et *Candida albicans*, mais avec une CMIs plus importante variant entre 18,5 et 47,5 µg/mL et une CMIs de l'ordre de 32,5 µg/mL contre *C. albicans*, respectivement. Cette huile essentielle

contient d'autres composés possédant une activité antimicrobienne, comme : le 1,8-cinéole (7,44%), le camphre (2,34%), le bornéol (2,26%), le terpinèn-4-ol (3,53%) et l'acétate de bornyle (1,18%).

Enfin, il est à noter que les huiles essentielles testées contiennent également des quantités non négligeables de bornéol, de *(E)*-β-caryophyllène et de germacrène D. L'activité antimicrobienne de ces deux derniers composés a été démontré par plusieurs études **(Skaltsa *et al.*, 2003 ; Rather *et al.*, 2012)**. En outre, les travaux effectués sur les huiles essentielles de *Micromeria cristana subsp. Phrygia* riches en bornéol, ont prouvé que ce composé est doté d'un grand pouvoir antimicrobien **(Tabanca *et al.*, 2001, Runyoro *et al.*, 2010 )**. En effet, les alcools terpéniques tel que le bornéol, sont connus pour leur fort pouvoir antimicrobien du fait de leur grande solubilité dans l'eau et donc ce qui leur confère une haute habilité à pénétrer à travers les parois des cellules bactériennes et fongiques **(Knobloch *et al.*, 1989)**.

Ainsi, bien que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est attribuée principalement à son composé majoritaire, l'effet synergique ou antagoniste de chacun de ses constituants présents en faible teneur est également considéré **(Chang *et al.*, 2001 ; Daferera *et al.*, 2003, Burt, 2004)**.

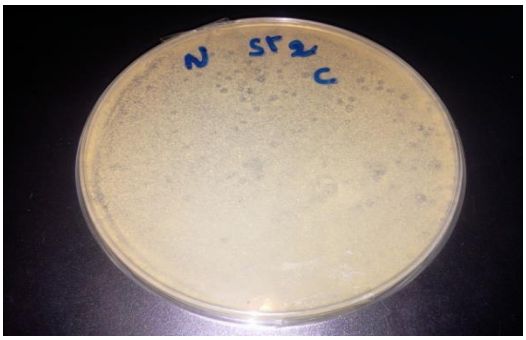


**Photo 8 : Résistance de *S. aureus* au camphre à la concentration de 2 µL/mL**

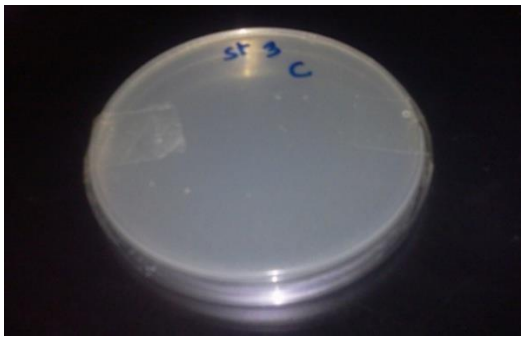


**Photo 9 : Inhibition totale de *S. aureus* par le camphre à la concentration de 3 µL/mL**

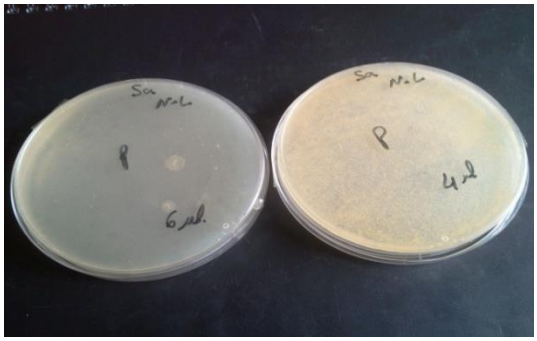


**Photo 10 : Inhibition totale de *S. aureus* par l'α-pinène à la concentration de 6 µL/mL**

**II.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata***

A travers nos recherches bibliographiques et compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il apparaît clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois tests chimiques, à savoir : le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), et le blanchiment du β-carotène. Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

Nous avons déterminé le pouvoir antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) (3 types chimiques cités précédemment) et des cônes de thuya (12 échantillons), choisis en fonction de leur profil chromatographique. Nous avons choisi une concentration de l'ordre de 800 mg/mL pour les quinze échantillons testés à raison de leur faible activité.

Dans les tableaux 14 et 17, nous rapportons les compositions chimiques des 15 échantillons testés.

**Tableau 17 : Composés majoritaires dans les échantillons des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata* utilisés pour l'étude de l'activité antioxydante**

| Composés majoritaires (en %) | GI | | | | GIIA | | | | GIIB | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AK12 | AK13 | AK14 | OM22 | G36 | G40 | H18 | OM24 | G38 | G39 | Sab6 | Sab9 |
| **α-Pinène** | **73,6** | **71,1** | **71,5** | **72,4** | **50,9** | **55,0** | **48,7** | **51,6** | **58,8** | **62,4** | **62,4** | **61,7** |
| **β-Pinène** | 1 ,8 | 1,9 | 1,6 | 1,8 | 1,7 | 1,3 | 1,6 | 1,3 | 1,6 | 1,6 | 2,0 | 1,7 |
| **Myrcène** | **4,8** | **3,7** | **2,9** | **5,6** | **10,1** | **2,1** | **3,5** | **3,5** | **9,1** | **2,9** | **11,6** | **4,8** |
| **Limonène** | **8,7** | **9,2** | **10,1** | **7,3** | **21,9** | **21,6** | **18,4** | **17,2** | **16,6** | **20,6** | **6,2** | **7,5** |
| **Terpinolène** | 0,5 | 0,5 | 0,4 | **1,3** | 0,9 | 0,5 | 0,4 | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 0,9 | 0,2 |
| **α-Campholénal** | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 0,1 | 0,2 | 1,1 | 0,5 | 0,6 | 0,2 | 0,5 | Tr | 0,2 |
| ***Trans*-Pinocarvéol** | 0,2 | 0,2 | 0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,7 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | ----- | 0,1 |
| **Acétate de bornyle** | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 1,7 | 1,1 | 2,0 | 1,7 | 1,1 | 0,7 | 1,1 | 1,4 |
| **Acétate d'α-terpinyle** | 0,8 | 1,1 | 1,2 | 0,6 | 2,3 | 2,0 | 4,1 | 2,7 | 1,9 | 1,5 | 1,4 | 1,8 |
| **α-Copaène** | 0,5 | 0,8 | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 0,1 | 0,5 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| **Sibérène** | 0,8 | 1,3 | 0,4 | 0,4 | 1,0 | 0,1 | 0,8 | 0,6 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,4 |
| ***(E)*-β-Caryophyllène** | 0,3 | 0,2 | 0,9 | 0,1 | 0,3 | 2,6 | 0,4 | 4,6 | 1,5 | 1,1 | 1,3 | 5,7 |
| **α-Humulène** | 0,1 | 0,1 | 0,2 | Tr | 0,1 | ----- | 0,1 | 1,2 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 1,9 |
| **Germacrène D** | 0,7 | 0,9 | 0 ,6 | **2,2** | 1,7 | 0,1 | **3,3** | **3,4** | 1,1 | 0,8 | 3,2 | 1,8 |
| **γ-Cadinène** | 0,5 | 0,7 | 0,1 | 1,1 | 0,2 | Tr | 0,9 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 1,1 | 2,0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Oxyde de caryophyllène** | Tr | Tr | 0,3 | Tr | Tr | 1,6 | 0,1 | 0,8 | 0,2 | 0,3 | Tr | 1,7 |
| ***epi*-Cubénol** | 0,2 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,6 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |

**H :** Honaïne, **G :** Ghazaouet, **Sab :** Sabra, **AK :** Aïn Kebira, **OM :** Ouled Mimoun, **Tr :** Trace.

### II.2.1. Piégeage du radical libre DPPH•(2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

Nous avons reporté sur le tableau ci-dessous les résultats du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata.*

**Tableau 18 : Activité antioxydante des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata* vis-à-vis du piégeage du radical libre DPPH exprimée en pourcentage d'inhibition**

| **Huiles essentielles (800 mg/mL)** | | **(% d'inhibition)** |
|---|---|---|
| **Parties aériennes** (Feuilles et fleurs) | Echantillon du sous-groupe IIA riche en α-pinène | **14,09 ± 0,24** |
| | Echantillon du groupe I riche en camphre | **14,52 ± 1,35** |
| | Echantillon du sous-groupe IIB riche en acétate de bornyle | 2,17 ± 0,36 |
| **cônes** Echantillons du groupe I | AK12 | 7,68 ± 0,83 |
| | AK13 | 9,03 ± 0,83 |
| | AK14 | 8,02 ± 0,35 |
| | OM22 | **47,46 ± 0,24** |
| **cônes** Echantillons du sous-groupe IIA | G36 | nd |
| | G40 | 5,62 ± 0,12 |
| | H18 | **15,02 ± 0,12** |
| | OM24 | **20,72 ± 0,36** |
| **cônes** Echantillons du sous-groupe IIB | G38 | 8,53 ± 0,12 |
| | G39 | 6,59 ± 0,25 |
| | Sab6 | 8,78 ± 0,00 |
| | Sab9 | 7,26 ± 0,00 |
| **Contrôles positifs (15 mg/mL)** | | **% d'inhibition** |
| Acide ascorbique | | 96,71 ± 0,04 |
| BHA | | 96,44 ± 0,05 |

AK : Aïn Kebira, OM : Ouled Mimoun, G : Ghazaouet, H : Honaïne, Sab : Sabra, nd : non déterminé.

Nous avons constaté que les huiles essentielles des parties aériennes et des cônes de *Tetraclinis articulata* possèdent une très faible activité antioxydante par comparaison avec les antioxydants standards. A une concentration de 800 mg/mL, l'huile essentielle des cônes de l'échantillon OM22 a montré un pouvoir réducteur le plus important, avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 47,46 ± 0,24%. Il est à noter que les huiles essentielles des cônes sont très riches en α-pinène, avec des pourcentages variant entre 48,7 et 73,6%. **Tepe *et al.*, 2005** rapportent que l'α-pinène est connu pour son faible effet antioxydant. Donc, la plus importante activité de cet échantillon est dû probablement à la présence en quantité appréciables du terpinolène, avec un pourcentage de l'ordre de 1,3% contre 0,2 à 0,9% pour

les autres échantillons, ainsi qu'à la présence du germacrène D. En effet, les échantillons des cônes H18 et OM24 qui contiennent une quantité non négligeable en germacrène D (3,3 et 3,4%, respectivement), présentent des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 15,02 ± 0,12 et 20,72 ± 0,36, supérieures au reste des échantillons.

L'activité antioxydante des composés majoritaires testés séparément donne des résultats inferieurs comparés à l'activité de l'huile essentielle globale (**Safaei-Ghomi *et al*., 2009)**. Cependant, les interactions synergiques entre les différents constituants d'une huile essentielle sont à l'origine d'un pouvoir antioxydant beaucoup plus important **(Vardar-Unlu *et al*., 2003 ; Ruberto et Barrata, 2000)**. En effet, certains composés tels que le γ-terpinène possèdent aussi une forte activité antioxydante **(Ruberto et Barrata, 2000)**.

Selon la littérature, l'activité antioxydante de *Tetraclinis articulata* a été étudiée par plusieurs auteurs. La majorité de ces travaux viennent confirmer nos résultats.

En effet, **Ben Jemia *et al.* (2012)** ont étudié l'activité antioxydante de l'huile essentielle des feuilles de thuya provenant de Tunisie. Les résultats du test DPPH ont montré une faible activité, avec une $CI_{50}$ de l'ordre de 25,50 ± 0,57 µg/mL, deux fois moins importante que celle du contrôle positif (BHT) ($CI_{50}$=12,0± 0,13µg/mL). Il est à noter que l'acétate de bornyle (31,4%), l'α-pinène (24,5%) et le camphre (20,3%) sont les constituants majoritaires de cette huile essentielle.

De même, **Djouahri *et al.*** en **2013a** ont étudié les activités antioxydantes des huiles essentielles des feuilles de thuya d'Algérie obtenues par deux méthodes : hydrodistillation conventionnelle (HD) et hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAHD). L'huile essentielle obtenue par MAHD a montré des activités antioxydantes plus élevées (DPPH, $CI_{50}$ : 191,72 ± 1,22 contre 517,65 ± 1,21). Cette activité est très faible par comparaison au composé de référence (Acide ascorbique, $CI_{50}$ = 31,64 ± 0,13 ; α-tocophérol, $CI_{50}$ = 33,51 ± 0,15). Ces huiles essentielles sont caractérisées par la prédominance de l'acétate de bornyle (24,4% ; 32,4%) et de l'α-pinène (23,6% ; 12,5%), suivi par le camphre (18,3% ; 21,4%), le limonène (7,0% ; 4,3%), le myrcène (5,5% ; 0,0%) et l'acétate d'α-terpinéol (1,0% ; 6,8%), respectivement.

En 2015, ces mêmes auteurs, **Djouahri *et al*.** rapportent également de très faible activité antioxydante des huiles des feuilles de thuya d'Algérie récolté dans quatre régions différentes (Zeddine, Aïn Defla ; Mansoura, Bordj-Bou-Arreridj ; Zekkar, Djelfa et Tazoult, Batna). Ces huiles essentielles présentent des valeurs de $CI_{50}$ variant entre de 113,47 ± 4,19 et 252,49 ± 6,14 µg/mL, nettement inférieures à celles des antioxydants standards (BHA : $CI_{50}$= 24,73 ± 0,11 µg/mL ; BHT : $CI_{50}$= 33,89 ± 0,16 µg/mL). Ces huiles essentielles sont

dominées également par l'α-pinène (16,3-25,3%), le camphre (17,2-21,4%) et l'acétate de bornyle (17,6-20,6%).

**Chikhoune *et al.*** en **2013** rapportent aussi de très faibles activités des huiles essentielles des feuilles et des cônes de thuya prélevés dans deux stations différentes en Algérie (Hammam Melouane et Tipaza). En effet, les pourcentages d'inhibition obtenus par le test de DPPH, varient entre 0,7 ± 0,0 et 11,6 ± 1,0% contre 91,1 ± 0,1% pour BHT et 93,5 ± 0,1 pour BHA. Les composés majoritaires de ces huiles essentielles sont respectivement l'α-pinène (24,9% ; 19,8%) et l'acétate de bornyle (40,2 ; 59,2%).

De même, les travaux menés par **Qadir et Shah,** en **2014** sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Pinus roxburghii* dont l'α-pinène (60,8%) et le β-pinène (30,2%) sont les composés majoritaires viennent confirmer nos résultats. En effet, cette huile possède un pouvoir antioxydant négligeable avec un pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH de 10% à une concentration de 100 µg/mL. Enfin, très récemment, **El Jemli *et al.*** en **2016** ont étudié le pouvoir antioxydant des huiles essentielles des feuilles de thuya prélevées dans la région de Marrakech dont les composés majoritaires sont l'acétate de bornyle (26,8%), le camphre (22,4%), suivis par l'α-pinène (7,2%) et le bornéol (6,4%). Ces huiles essentielles présentent une faible activité antioxydante, avec une $CI_{50}$ obtenue par le test de DPPH, de l'ordre de $12{,}05\times10^{3}$ ± 0,24 µg/mL, nettement inférieure à celle du standard ($CI_{50}$ = 4,20 ± 0,02 µg/mL).

Par contre, les travaux de **Dai *et al.*** en **2013** sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Wedelia prostrata* et de ses composés majoritaires (limonène et α-pinène) par la méthode de piégeage de radical libre DPPH, avancent une activité modérée pour l'ensemble des échantillons testés avec un pourcentage d'inhibition de 88,1% à une concentration de 100 µg/mL pour l'huile essentielle.

L'étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle des feuilles de *Juglans regia* dont la composition chimique est dominée par le β-pinène (30,5%), suivi par l'α-pinène (15,1%), β-caryophyllène (15,5%), germacrène D (14,4%) et le limonène (3,6%) par l'utilisation de la méthode de piégeage du radical libre DPPH, montre que l'huile possède une activité antioxydante comparable à celle des standards avec une $CI_{50}$ =34,5 µg/mL plus importante que celle des composés testés séparément, à savoir : β-pinène, β-caryophyllène et germacrène D dont les valeurs des $CI_{50}$ sont : 78,1 µg/mL, 73,2 µg/mL, et 80,0 µg/mL respectivement **(Rather *et al.*, 2012)**.

**Lemos *et al.* (2015)** montrent que les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* qui contiennent entre 24,4 et 35,9% de camphre, présentent une très faible activité antioxydante

avec des $CI_{50}$ variant entre 13,92 et 27,74 µg/mL, moins importante que le composé de référence (BHA : 3,84 et 4,92 µg/mL).

**Šarac *et al.*** en **2014,** montrent que les huiles essentielles de trois sous-espèces de *Pinus nigra* possède un faible pouvoir d'inhibition de radical libre DPPH avec des valeurs des $CI_{50}$ variant entre 25,080 et 28,677 mg/mL, très importantes par rapport aux antioxydants synthétique, BHA et vitamine C avec des $CI_{50}$ de l'ordre de 0,093 mg/mL et 0,054 mg/mL respectivement. Il est à noter que ces huiles essentielles sont caractérisées par la prédominance des mono- et sesquiterpènes hydrocarbonés : α-pinène (42,3-50,8%), germacrène D (23,7-30,6%), *(E)*-caryophyllène (7,3-8,1%), et β-pinène (3,1-6 ,9%).

Les résultats obtenus par **Amarti *et al.*** en **2011**, montrent que les huiles essentielles de *Thymus capitatus, T. ciliatus* et *T. bleicherianus* témoignent d'un pouvoir antioxydant *in vitro* très intéressant, alors que celle de *T. algeriensis* possède un faible effet antioxydant. Cette forte capacité de réduction des radicaux libres des huiles essentielles des trois première espèces végétales est du à leurs profils chimiques, riches en phénols (thymol et carvacrol). En effet, ces phénols ont déjà prouvé leur fort pouvoir antioxydant **(Kulisic *et al.*, 2004 ; Sokmen *et al.*, 2004 ; Tepe *et al.*, 2005 ; 2007)**. Par contre, l'huile essentielle de *T. algeriensis* est riche en camphre (27,7%) et en α-pinène (20,5%). Elle contient également du thymol, mais en faible teneur (0,2%).

**Gao *et al.*, 2011** ont étudié l'activité antioxydante de cinq échantillons d'huile essentielle de *Citrus reticulata* originaire de Chine dont la composition est nettement dominée par le limonène, par la méthode de piégeage de radical libre DPPH. Ils rapportent un pouvoir antioxydant faible par rapport à la vitamine C ($CI_{50}$=3,1 ± 0,2 µg/mL). Les valeurs des $CI_{50}$ obtenues varient entre 6,3 ± 0,5 et 13,40 ± 0,46 mg/mL.

En outre, **Herzi *et al.* (2013)** ont évalué l'activité antioxydante des huiles essentielles des feuilles de thuya extraites par différentes méthodes (hydrodistillation (HD) et l'extraction par fluide supercritique (SFE) en utilisant différentes pression (90, 280 et 1 000 bar). L'huile essentielle obtenu par l'extraction par fluide supercritique à 1 000 bar possède le pouvoir antioxydant le plus important avec une $CI_{50}$ de l'ordre 108,16 ± 3,07 µg/mL. Il est à noter que cette huile est la plus riche en composés phénoliques 267,90 EAG mg/g. Par contre, l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation, très pauvre en composés phénoliques 8,89EAG mg/g, présente la plus faible activité antioxydante, avec une valeur de $CI_{50}$ de 3681,49 ± 69,33 µg/mL. Les polyphénols sont connus pour avoir une capacité élevée de piégeage des radicaux libres du à la présence des substituants d'hydroxyle dans leur structure aromatique **(Villaño *et al.*, 2007)**.

De même, les huiles essentielles des feuilles, riches en phénols totaux (320,54 mg EAG/g HE), ont manifesté un important potentiel antioxydant, supérieur à celui du composé de référence (butylhydroxytoluène ou BHT). En effet, le pourcentage d'inhibition obtenu par le test de DPPH est de l'ordre de 89,3% contre 50,3% **(Bourkhiss *et al.*, 2010b)**.

Nous pouvons conclure que les études effectuées sur les plantes médicinales démontrent une variabilité de la composition des huiles essentielles qui influe sur le potentiel des activités biologiques. Cette variation a été dans la plupart du temps corrélée avec la différence dans les régions, la période de la récolte **(Chalchat *et al.*, 1993 ; Celiktas *et al.*, 2007a ; 2007b ; Jamshidi *et al.*, 2009)**, les conditions environnementales et agronomiques **(Moghtader et Afzali, 2009)** et la méthode d'extraction **(Lopez *et al.*, 2005 ; Okoh *et al.*, 2010 ; Djouahri *et al.*, 2013b)**.

### II.2.2. Activité antioxydante par le test de blanchissement du *β*-carotène

Pour le test du blanchissement du *β*-carotène, nous avons obtenu une absence totale d'activité antioxydante à des concentrations de l'ordre de : 1,562 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 mg/mL). Nous avons également testé l'huile essentielle pure, mais, nous avons rencontré des problèmes de solubilisation de cette huile dans de l'eau oxygénée (selon le protocole utilisé).

### II.2.3. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Dans ce test, l'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés **(Ozturk *et al.*, 2007)**. La concentration $CE_{50}$, qui est définie comme étant la concentration effective à laquelle l'absorbance est égale à 0,5 ; est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives. Le tableau 19 rapporte les valeurs de la $CE_{50}$ des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata.*

**Tableau 19 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de *Tetraclinis articulata* exprimé en $CE_{50}$**

| Huiles essentielles | | $CE_{50}$ (mg/mL) |
|---|---|---|
| **Parties aériennes** | Echantillon du sous-groupe IIA riche en α-pinène | **48,28 ± 0,08** |
| **Feuilles et fleurs** | Echantillon du groupe I riche en camphre | 138,16 ± 0,70 |
| | Echantillon du sous-groupe IIB riche en acétate de bornyle | 144,00 ± 0,47 |
| **cônes** | AK12 | 146,50 ± 0,70 |
| | AK13 | 138,17 ± 0,23 |
| **Echantillons du groupe I** | AK14 | 135,00 ± 0,47 |
| | OM22 | 144,00 ± 1,41 |

| | | |
|---|---|---|
| **Les cônes**<br>**Echantillons du sous-groupe IIA** | G36 | 129,66 ± 0,00 |
| | G40 | 112,13 ± 1,23 |
| | H18 | **97,38 ± 0,53** |
| | OM24 | 157,66 ± 0,47 |
| **Les cônes**<br>**Echantillons du sous-groupe IIB** | G38 | 146,83 ± 1,65 |
| | G39 | 139,83 ± 0,70 |
| | Sab6 | 156,17 ± 0,23 |
| | Sab9 | 151,00 ± 0,47 |
| **Contrôles positifs** | | **$CE_{50}$ (µg/mL)** |
| Acide ascorbique | | 120,20 ± 1,08 |
| BHA | | 112,80 ± 1,33 |

Pour ce test, une gamme de concentration a été préparée pour chaque échantillon d'huile essentielle. Les valeurs des densités optiques obtenues montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur en fonction des concentrations. Ces résultats ont permis de tracer des courbes ayant des allures plus ou moins linéaires **(Figure 20, 21, 22, 23)**.

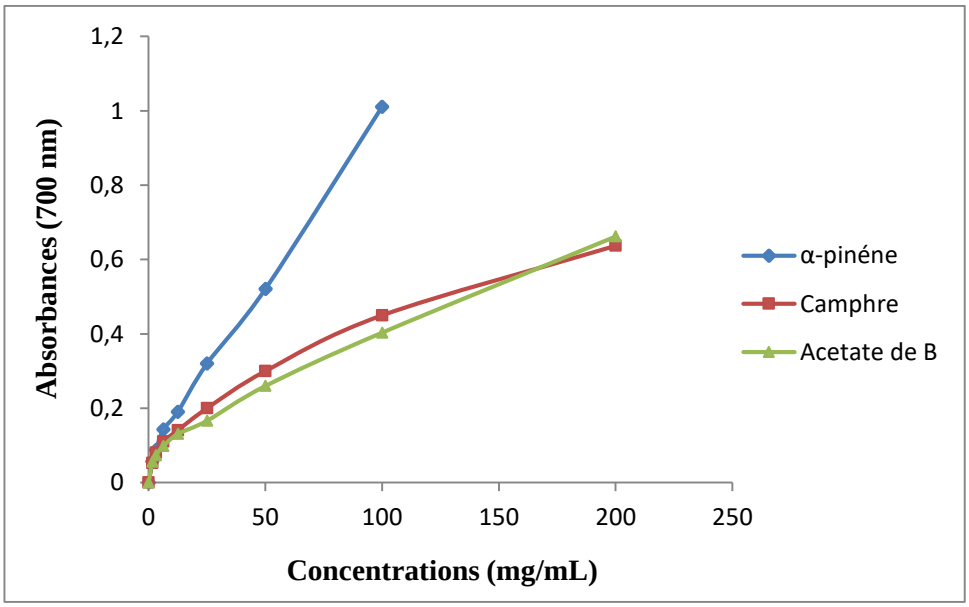



**Figure 20 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* testé par la méthode de FRAP**

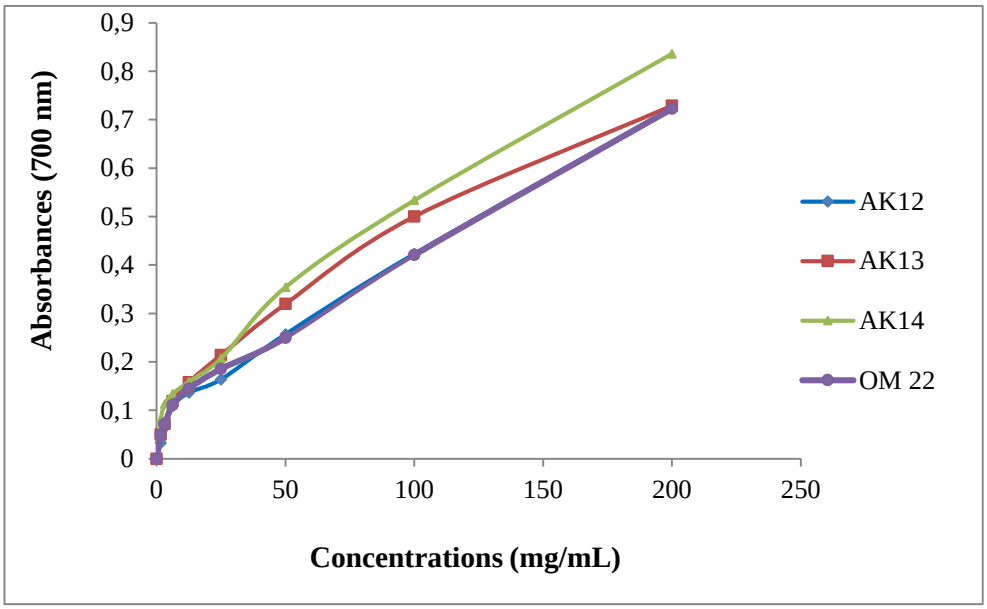



**Figure 21 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des cônes (échantillons du groupe I) de *Tetraclinis articulata* testé par la méthode de FRAP**

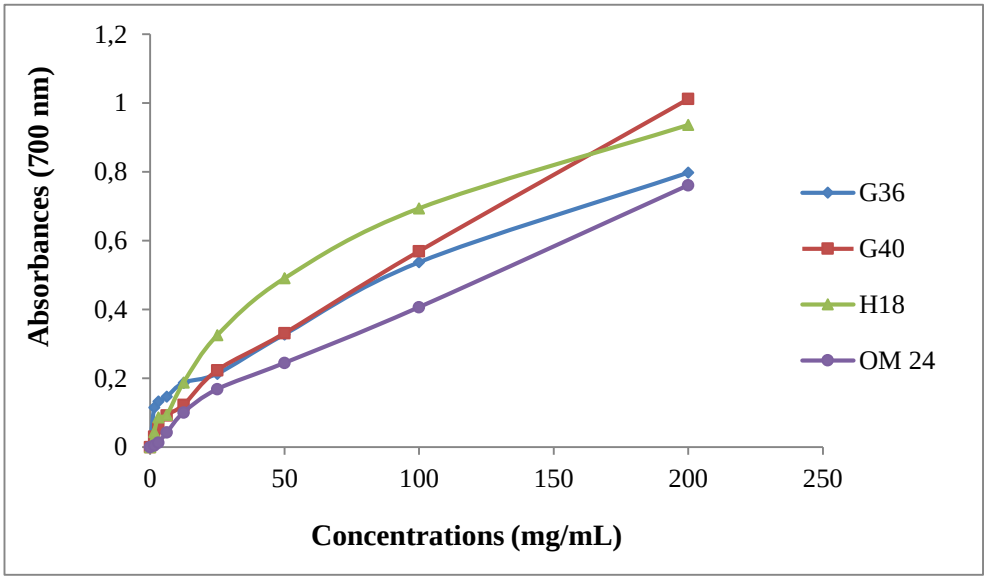



**Figure 22 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des cônes (échantillons du sous-groupe IIA) de *Tetraclinis articulata* testé par la méthode de FRAP**

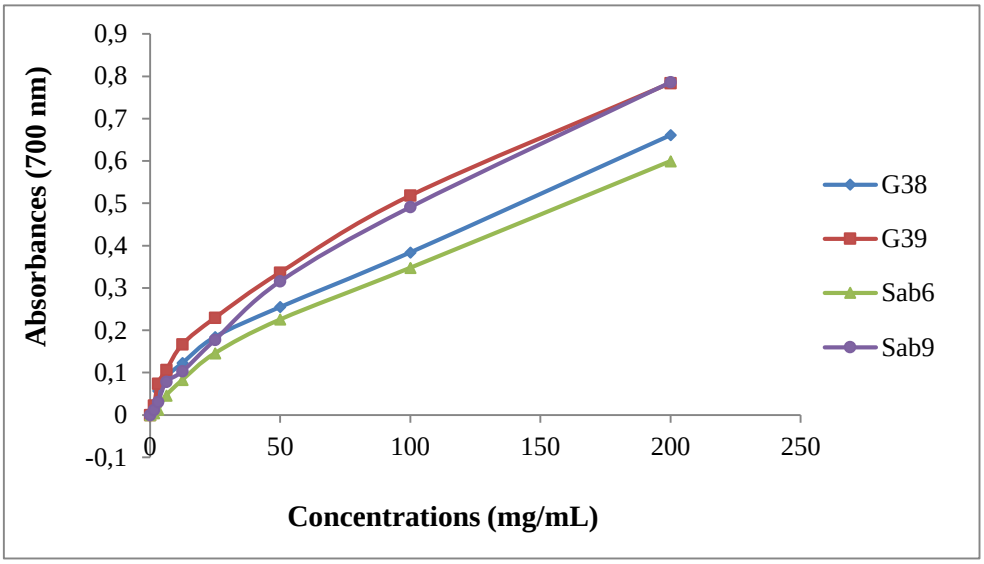



**Figure 23 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles des cônes (échantillons du sous-groupe IIB) de *Tetraclinis articulata* testé par la méthode de FRAP**

Les données du tableau 18, indiquent que le pouvoir réducteur varie considérablement entre les différents échantillons avec des valeurs qui oscillent entre 48,28 ± 0,08 mg/mL pour l'échantillon des parties aérienne riche en α-pinène et 157,66 ± 0,47 mg/mL pour l'échantillon des cônes riche en limonène. Cependant, ces valeurs restent très faibles par rapport à celles des antioxydants de référence utilisés (120,20 ± 1,08 µg/mL pour l'acide ascorbique et 112,80 ± 1,33 µg/mL pour le BHA).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Djouahri *et al.*** en **2015**. Les huiles essentielles des feuilles de *Tetraclinis articulata* récoltées dans quatre stations en Algérie (Zeddine, Mansoura, Zakkar et Tazoult) ont présenté un pouvoir réducteur faible variant entre 41,12 ± 1,14 et 57,49 ± 1,36 µg/mL, par comparaison au pouvoir réducteur des deux contrôles positifs utilisés BHA et BHT ($EC_{50}$ = 15,49 ± 0,131 µg/mL et 16,65 ± 0,18 µg/mL, respectivement). De même, les travaux d'**El Jemli *et al.*** en **2016** avancent un très pouvoir antioxydant des huiles essentielles des feuilles de thuya prélevées dans la région de Marrakech dont les composés majoritaires sont l'acétate de bornyle (26,8%), le camphre (22,4%), suivis par l'α-pinène (7,2%) et le bornéol (6,4%). En effet, le résultat du pouvoir antioxydant obtenu par FRAP a montré une activité très faible par comparaison au témoin positif, avec une valeur de $CE_{50}$ de $0,15\times10^3$ ± 0,01 µg /mL contre 7,02 ± 0,02 µg/mL pour BHT.

En revanche, **Djouahri *et al.*** en **2013a** ont étudié l'activité antioxydante des huiles essentielles des feuilles de thuya prélevées dans la région d'Aïn-Defla (Algérie) et obtenues

par deux méthodes d'extraction différentes : hydrodistillation (HD) et hydrodistillation assistée par les micro-ondes (MAHD). Les huiles essentielles ayant présentées une activité réductrice la plus élevée sont celles extraites par MAHD avec des $CE_{50}$ de l'ordre de 30,19 ± 0,15 µg/mL contre 45,12 ± 0,14 µg/mL pour les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation. Ce résultat est comparable à celui du composé de référence (α-tocophérol, $CE_{50}$ = 30,55 ± 0,14 µg/mL).

# Conclusion

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires et leurs subsistances.

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales et bon nombre d'entres elles sont des espèces endémiques. Elles constituent une ressource non négligeable en matière de molécules bioactives. Néanmoins, cette ressource reste peu exploitée que se soit au niveau des études scientifiques ou au niveau économique. La région nord-ouest d'Algérie abrite plusieurs espèces endémiques et la plupart d'entres elles sont à usage médicinal.

Ce travail, réalisé en collaboration avec l'équipe « Chimie & Biomasse » de l'université de Corse, s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la biomasse végétale qui représente un vaste réservoir de composés naturels à forte valeur ajoutée. L'exploitation de ces composés peut donc participer à rendre l'utilisation de la biomasse plus durable et plus viable économiquement. L'activité forestière génère chaque année une quantité importante de biomasse résiduelle, susceptible de constituer une matière première intéressante pour la production d'huiles essentielles qui trouvent de nombreuses applications dans des secteurs très variés (cosmétique, parfumerie, aromathérapie/phytothérapie) et se présentent sous forme de mélanges complexes. Malheureusement, en Algérie, les produits forestiers sont mal valorisés et la production est en nette régression à cause du vieillissement des peuplements, des modes d'exploitation, d'une gestion inappropriée et des coupes illicites de bois. La dégradation de la biodiversité et des ressources forestières par les feux, les ravageurs, les maladies, les défrichements, le pâturage et la désertification s'est amplifiée ces dernières années. Ainsi, la valorisation du potentiel de production, la promotion des activités de nature à donner une valeur ajoutée aux produits et le développement des produits forestiers est une intégration plus performante à l'économie nationale.

Cependant, la valorisation de ces produits naturels passe par une étape d'analyse afin de les caractériser. En effet, la détermination de la composition chimique, la mise en évidence d'une éventuelle activité biologique constituent des étapes nécessaires pour la valorisation et donc la commercialisation dans les meilleures conditions possibles.

Dans ce contexte, l'analyse chimique des huiles essentielles est basée sur le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG) qui individualise les constituants du mélange et une technique spectroscopique (la SM ou l'IRTF éventuellement la RMN), qui

permet d'identifier les constituants par comparaison avec les données spectrales de produit de référence contenues dans une bibliothèque des spectres.

Parallèlement, le laboratoire de l'équipe « Chimie et biomasse » de l'université de Corse a mis au point et développé une technique d'analyse des mélanges complexes, basée sur l'utilisation de la RMN $^{13}C$ comme outil d'identification des constituants, et éventuellement leur quantification, sans séparation préalable ou avec un fractionnement réduit au minimum. Un logiciel informatique, conçu et développé au laboratoire, permet de comparer les déplacements chimiques des spectres construites au laboratoire ou avec les données de la littérature.

Ainsi, l'objectif de notre travail est la valorisation d'une espèce végétale, à savoir : *Tetraclinis articulata,* poussant à l'état spontané dans huit stations différentes de la région de Tlemcen (nord-ouest d'Algérie), en déterminant la composition chimique et le pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) et des cônes de cette plante. Nous avons également caractérisée les huiles essentielles des parties aériennes d'un même pied de thuya au cours d'une année.

Les cônes de l'espèce *Tetraclinis articulata* sont plus riches en huile essentielle avec des teneurs variant entre (0,17-1,13%) par comparaison avec les rendements en huiles essentielles des parties aériennes (feuilles et fleurs) (0,03-0,86%). Nous avons noté qu'il n'y a aucune relation directe entre le rendement en huile essentielle et l'altitude. Par ailleurs, les teneurs en huiles essentielles des feuilles d'un même pied de thuya récolté dans la station d'Aïn Kebira au cours d'une année sont moins importants et varient fortement d'un mois à l'autre de 0,16 à 0,66%. Les rendements les plus importants sont observés pour les mois de juin et de décembre (0,57 et 0,66% ; respectivement).

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle des parties aériennes de *Tetraclinis articulata,* par combinaison de trois méthodes d'analyse : une technique chromatographique (CPG-Ir) et deux techniques spectrales (CPG-SM et RMN $^{13}C$). Cette analyse nous a permis d'identifier 35 composés qui représentent 97,5% de la composition totale. Les composés majoritaires sont l'α-pinène (23,6%), l'acétate de bornyle (20,7%), le camphre (17,3%), suivis par le limonène (9,5%) et le myrcène (3,8%). Dans un second temps, nous avons étudié la variabilité de la composition chimique de 50 échantillons provenant de huit stations différentes dans la région de Tlemcen, situées entre 42 m et 1210 m d'altitude [ Honaïne (H1 à H4), Sebdou (S1 à S5), Ouled Mimoun (OM1 à OM6), Beni Khalled (BK1 à BK6), Souk Tlata (ST1 à ST6), Ghazaouet (G1 à G7), Aïn Kebira (AK1 à AK7) et Sabra (Sab1 à Sab8)]. L'analyse en composante principale

(ACP) des résultats ont permis d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage. La représentation graphique des échantillons suggère une répartition en deux groupes. Les échantillons du groupe I (9 sur 50 échantillons), sont caractérisées par la prédominance du camphre (M = 30,9% ; ET = 4,2), suivi par l' α-pinène (M = 19,1% ; ET = 7,6) et l'acétate de bornyle (M = 11,4% ; ET = 9,6). Les échantillons de ce groupe contiennent également deux autres monoterpènes : le limonène (M = 7,3% ; ET = 2,6) et le bornéol (M = 6,2% ; ET = 4,1) à des teneurs appréciables. Plusieurs sesquiterpènes hydrocarbonés, comme *(E)*-β-caryophyllène (M = 1,2% ; ET = 0,6) et germacrène D (M = 0,4% ; ET = 0,4) sont également présents en faibles teneurs. Le groupe II est subdivisé en deux sous-groupe : Le sous-groupe IIA (8 sur 50 échantillons) est caractérisé par un contenu très élevé en α- pinène (M = 45,4% ; ET = 5,6), suivi par l'acétate de bornyle (M = 10,5%; ET = 4,6). Nous notons en occurrence la présence du germacrene D (M = 5,1% ; ET = 4,7). Ce sous-groupe contient également des proportions comparables de limonène (M = 6,8% ; ET = 2,7), de camphre (M = 4,0% ; ET = 3,8), de myrcène (M = 3,9% ; ET = 2,4) et de *(E)*-β-caryophyllène (M = 6,3% ; ET = 2,3). En revanche, de faibles quantités en bornéol (M = 1,1% ; ET = 1,2) ont été détectées. Le sous-groupe IIB (33 sur 50 échantillons), rassemble les compositions caractérisées par des teneurs comparables en α-pinène (M = 28,2% ; ET = 6,4), et en acétate de bornyle (M = 24,5% ; ET = 7,7). Le camphre (M = 10,0% ; ET = 6,0) et le limonène (M = 7,6% ; ET = 2,1) sont également présents en quantités appréciables. Les échantillons de ce sous-groupe contiennent d'autres composés importants, à savoir : le myrcène, le bornéol, le *(E)*-β-caryophyllène et le germacrène D. La comparaison de nos résultats avec les données de la littérature révèle que la composition chimique des échantillons du groupe I semble originaire, puisque aucun travail ne rapporte une teneur élevée en camphre suivi par l'α-pinène. Il en est de même pour le sous-groupe B.

Nous avons également déterminé la composition chimique des huiles essentielles des feuilles récoltées à partir d'un même pied dans la station d'Aïn Kébira, au cours d'une année. Nous avons effectué un seul prélèvement chaque mois. Ainsi, nous avons réalisé douze échantillons à partir du mois de mars 2014 (début de floraison) jusqu'au mois du février 2015. Nous avons constaté que la composition est qualitativement homogène mais quantitativement différente. Cette importante variabilité concerne en particulier les composés majoritaires, à savoir : α-pinène (11,1-24,6%), acétate de bornyle (8,6-41,1%) et camphre (2,2-16,4%). En effet, dans les deux premiers mois mars et avril où le pied de *Tetraclinis articulata* est en pleine floraison, l'acétate de bornyle est le composé majoritaire (34,5% et 41,1%,

respectivement). Ce constituant diminue (8,6%) brutalement à la fin de la fructification (septembre). Par contre, le camphre est élevé à la fin de la fructification (22,5%) puis diminue brusquement avant floraison, avec des pourcentages variant entre 2,2 et 4,9% (entre octobre et février). Le bornéol présente le même comportement que le camphre. Le pourcentage en α-pinène est important du début jusqu'à la fin de la fructification puis diminue juste avant et pendant la floraison. Enfin, Nous avons constaté que les teneurs en *(E)*-β-caryophyllène et en germacrène D sont élevées de octobre à février (après fructification jusqu'à avant la floraison).

Enfin, nous avons étudié la variabilité chimique de l'huile essentielle de 40 échantillons de cônes récoltés dans les huit stations citées précédemment. Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse détaillée de six échantillons d'huile essentielle de cônes. Ainsi, nous avons identifié, par combinaison de la CPG(Ir), de la RMN $^{13}C$ et de la CPG-SM, 38 composés, représentant 94,1-99,0% de la composition totale. Les six échantillons sont largement dominés par des monoterpènes hydrocarbonés : l'α-pinène comme composé majoritaire (47,1-73,6%), suivi de mycène (1,7-11,6%) et de limonène (6,9-21,6%). Certains sesquiterpènes sont présents en quantité appréciables, à savoir : *(E)*-β-caryophyllène (0,3-6,3%), γ-cadinène (0,1-3,4%), germacrène D (0,1-3,2%), oxyde de caryophyllène (tr-2,7%), α-humulène (0,1-1,7%). Enfin, nous avons le couplage CPG-SM a proposé deux diterpènes : *(Z)*-biformène (tr-0,8%) et *(E)*-biformène (tr-0,6%) dont leur identification a été, par la suite, confirmée par RMN $^{13}C$. Ces composés sont décrits, à notre connaissance, pour la première fois dans l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*. Ensuite, nous avons étudié la variabilité de la composition chimique de 40 échantillons. L'analyse en Composante Principale (ACP) des résultats a permis d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage. Ainsi, nous avons mis en évidence deux groupes chimiques. En parallèle, le groupe II a été divisé en deux sous-groupes IIA et IIB. Le groupe I constitué de 14 échantillons, est largement dominé par l'α-pinène (M : 69,7% ; ET : 2,8), suivi de limonène (M : 10,6% ; ET : 2,6). D'autres composants sont présents en faibles teneurs (pourcentage moyen inférieur à 2%), à l'exception du myrcène (M : 3,9% ; ET : 1,2). Le groupe II rassemble 26 échantillons avec également l'α-pinène comme composé majoritaire, mais en proportion moins importante que le groupe I. En effet, ce groupe est subdivisé en deux sous-groupes : Le sous-groupe IIA (7 des 40 échantillons) est caractérisé par la prédominance de l'α-pinène (M : 51,9% ; ET : 3,3) suivi de limonène (M : 17,1% ; ET : 5,0). D'autres composés sont également présents en quantité appréciable : acétate d'α-terpinyle (M : 2,6% ; ET : 0,8), *(E)*-β-caryophyllène (M : 2,9% ; ET : 2,1) et germacrène D (M : 2,5% ;

ET : 2,0). Le sous-groupe IIB contient 19 échantillons. Les composés majoritaires sont également l'α-pinène (M : 61,6% ; ET : 2,3) et le limonène (M : 13,9% ; ET : 4,4). En fonction des pourcentages, ce sous-groupe IIB se situe entre le groupe I et le sous-groupe IIA. On note aussi la même observation concernant les monoterpènes oxygénés et les sesquiterpènes hydrocarbonés cités précédemment. Ainsi, l'huile essentielle des cônes de *Tetraclinis articulata* est largement dominée par l'α-pinène, suivi de limonène. Cependant, en se basant sur les quantités de ces deux constituants, elle présente une variabilité chimique quantitative avec trois compositions différentes. Ces dernières sont retrouvées dans toutes les stations de récolte. La variabilité chimique de thuya semble donc être indépendante des conditions pédoclimatiques. Par ailleurs, ce travail constitue la première étude réalisée sur l'huile essentielle des cônes de thuya avec un échantillonnage important (40 échantillons) dans une région bien définie.

L'ensemble de ces résultats nous amène à conclure que l'espèce *Tetraclinis articulata*, récoltée dans huit stations différentes de la région de Tlemcen, est susceptible d'avoir un intérêt industriel du fait son aire de répartition large dans la région, même s'il faut veiller à une gestion raisonnée et durable de cette ressource et de sa richesse en huile essentielle, en particulier pour les cônes.

Ces huiles essentielles présentent aussi des activités biologiques, et essentiellement des activités antimicrobienne et antioxydante. Dans ce contexte, nous avons testé l'effet biologique de nos huiles essentielles :

Dans un premier temps, nous avons testé l'activité antimicrobienne de trois échantillons d'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fleurs) appartenant aux trois types chimiques différents : huile essentielle à α-pinène, à camphre et à acétate de bornyle vis-à-vis de dix micro-organismes (six souches bactériennes, deux levures et deux champignons filamenteux), en utilisant la méthode de diffusion sur disque et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de contact direct en milieu gélosé.

Les huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* appartenant aux trois types chimiques différents, agissent de façon très active sur les deux souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* ainsi que sur la souche fongique filamenteuse, à savoir : *Aspergillus fumigatus*, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 20 et 38,5 mm. Cependant, l'huile essentielle à camphre s'est avérée la plus intéressante, avec des CMIs variant entre 1 et 3 µL/mL. En revanche, l'ensemble des huiles essentielles testées sont inactives vis-à-vis de souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* qui se révèlent très

résistantes. Par ailleurs, les autres souches microbiennes se sont montrées plus ou moins sensibles à tous ces huiles essentielles, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 9,3 et 19 mm. Enfin, l'huile essentielle à α-pinène reste la moins efficace, avec des CMIs variant entre 2 et 6 µL/mL, vis-à-vis des microorganismes les plus sensibles. Ces résultats constitue une justification scientifique de l'usage traditionnel de cette plante dans le traitement des infections respiratoires et intestinales et les douleurs gastriques.

Ainsi, les huiles essentielles extraites de *Tetraclinis articulata* représentent un potentiel important en matière d'antimicrobiens naturels, en particulier les huiles essentielles à camphre vis-à-vis de *S. aureus* et *Aspergillus fumigatus*. En effet, le staphylocoque doré est la souche la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire. Elle partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales. Il est également en tête des bactéries responsables d'intoxications alimentaires. De même, l'espèce *Aspergillus fumigatus* est responsable de plus de 80% des aspergilloses humaines. Il est l'agent principal de l'aspergillose chez les patients présentant une altération de l'immunité naturelle.

Enfin, nous avons étudié l'activité antioxydante de ces trois huiles essentielles des parties aériennes (α-pinène, camphre et acétate de bornyle) et celle de douze échantillons des cônes choisis selon trois types chimiques différents (pourcentages en α-pinène et en limonène) en appliquant trois méthodes : Piégeage du radical libre DPPH, le test de blanchissement du *β*-carotène et la méthode de réduction du Fer (FRAP). Les résultats obtenus par les trois méthodes ont révélé un faible pouvoir antioxydant pour l'ensemble des huiles essentielles testées par comparaison aux composés de référence.

Ces résultats dans le domaine de la recherche des antimicrobiens naturels sont prometteurs et offrent de nombreuses perspectives. Il serait intéressant de poursuivre ce travail selon quatre axes:

- ✓ Investiguer profondément et rechercher des applications de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata*, seront les principales perspectives ;
- ✓ Entreprendre une étude phytochimique de cette espèce afin d'isoler d'autres métabolites secondaires ;
- ✓ Tester l'activité anti-inflammatoire et particulièrement l'activité antidiabétique de *Tetraclinis articulata* ; ces activités biologiques répondent aux usages majeurs de la plante selon la médecine traditionnelle.

- ✓ Entreprendre une étude de la toxicité de ceux-ci sur différentes lignées cellulaires (*in vitro*) et sur des modèles utilisant les animaux (*in vivo*) afin de déterminer les doses thérapeutiques.

# Références

# Bibliographiques

**Abbas Y, Ducousso M, Abourouh M, Azcon R, Duponnois R. (2006)** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters woodlands in Morocco. *Annals of Forest Science*, ***63***, 285-291.

**Abi-Ayad FZ, Abi-Ayad M, Lazouni HA, Rebiahi SA, Bessiere (2011)** Antibacterial activity of essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Algeria flora. *Journal of Microbiology Biotechnology Research*, ***1,*** 1-6.

**Abi-Ayad FZ, Abi-Ayad M, Lazouni HA, Rebiahi SA. (2013)** Evaluation of *Tetraclinis articulata* essential oil from Algeria flora as a potential source of antifungal activity and study of its chemical composition. *Indian Academy of Wood Science*, ***10***, 9-15.

**Achak N, Romane A, Alifriqui M, Markouk M. (2009)** Chemical composition, organic and mineral contents of leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from the Tensift-Al Haouz, Marrakech region (Morocco). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, ***12***, 198-204.

**Acherar M. (1981)** La colonisation des friches par le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) dans les basses garrigues du monpelliérais. Thèse de doctorat, Sp, USTL, Monpellier, 210.

**Adams RP. (1989)** Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press, San Diego, 780.

**Adams RP. (2001)** Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured: Carol Stream, 798.

**Ahmad VU, Jassbi AR.(1999)** Analysis of the essential oil of *Echinophora sibthorpiana* guss. By means of GC, GC/MS and 13C-NMR techniques. *Journal of Essential Oil Research*, ***11,*** 107-108.

**Ait Igri M, Holeman M, Ilidrissi A, Berrada M. (1990)** Contribution à l'étude des huiles essentielles des rameaux et de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, ***24***, 36-43.

**Akash Kedia BP. (2013)** Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 1-7.

**Alami S. (2013)** Contribution à la caractérisation physique et mécanique et à la valorisation par séchage du bois de la forêt marocaine cas des eucalyptus et de la loupe de thuya. Thèse doctorat en sciences du bois, Université Mohammed V-Agdal, 148.

**Albert K, Dachtler M, Glaser E, Händel H, Lacker T, Schlotterberck G, Strohschein S, Tseng LH, Braumanu U.** (**1999)** On-line coupling of separation techniques to NMR. *Journal of High Resolution Chromatography*, ***22,*** 135-143.

**Aligianis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, Tsarbopoulos A. (2001)** Composition and antimicrobial activity of essential oils of five taxa of *Sderitis* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***49***, 811-815.

**Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M, Koltas S. (2004)** Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*, **11**, 657-661.

**Àlvarez SL, Cortadi A, Juárez MA, Petenatti E, Tomi F, Casanova J, van Baren CM, Zacchino S, Vila R. (2012)** (-)-5,6-Dehydrocamphor from the antifungal essential oil of *Zuccagnia punctata. Phytochemistry Letters, **5**,* 194-199.

**Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Aafi A, Farah A, Aarab L, El Ajjouri M, Guedira A, Chaouch A. (2011)** Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters, **158 (4)**,* 513-523.

**Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. (2013)** Antioxidant Activity of Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, **16**,* 835-847.

**Andrade Fabio DP, Santos Lourdes C, Datchler Markus, Albert K, Vilegas W. (2002)** Use of on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*. *Journal of Chromatography A, **953**,* 287-291.

**Angioni A, Barra B, Russo MT, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. (2003)** Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**,* 3073-3078.

**Ao Y, Satoh K, Shibano K, Kawahito Y, Shioda S. (2008)** Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from Rutaceae. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutr*ition, ***43(1)**,* 6–12.

**Aouinty B, Oufara S, Mellouki F, Mahari S. (2006)** Évaluation 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). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, **10**,* 67-71.

**Armaka M, Papanikolaou E, Sivropoulou A, Arsenakis M. (1999)** Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of Herpes simplex virus type-1. *Antiviral Research, **43**,* 79-92.

**Asbahani AE, Miladi K, Badri W, Sala M, Aït Addi EH, Casabianca H, El Mousadik A, Hartmann D, Jilale A, Renaud FNR, Elaissari A. (2015**) Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics, **483**,* 220-243.

**Azzi R, Djaziri R, Lahfa F, Sekkal FZ, Benmehdi H, Belkacem N. (2012)** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research, **6(10**),* 2041-2050.

**Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008)** Biological effects of essential oils-A review, *Food and Chemical Toxicology, **46**,* 446-475.

**Baldovini N, Tomi F, Casanova J. (2001)** Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by 13C-NMR. *Phytochemical Anal*ysis, ***12***, 58-63.

**Balkis MM, Leidish SD, Mukheryei PK, Ghannoun MA. (2002)** Mechanism of fungal resistance. *Drugs*, ***62***, 1025-1040.

**Bandoniene D, Murkovic M, Pfannhauser W, Venskutonis PR, Gruzdiene D. (2002)** Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods. *European Food Research and Technology*, ***214***, 143-147.

**Barel S, Segal R, Yashphe J. (1991)** The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *Journal of Ethnopharmacol.*, ***33***, 187-191.

**Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Quilez J, Akssira M, Mellouki F, Akkad S.** (**2005**) Chemical composition of the essential oils of leaves and wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Journal of Essential Oil Research*, ***17***, 166-168.

**Bekhechi C, Atik Bekkara F, Casanova J, Tomi F. (2011)** Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Achillea odorata* L. subsp. *pectinata* (Lamk.) var. *microphylla* (Willd.) Willk. From North-Western Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, ***23***, 42-46.

**Bekhechi C, Atik Bekkara F, Consiglio D, Bighelli A, Tomi F. (2012)** Chemical variability of the essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. Chemistry & *Biodiversity*, ***9 (12)***, 2742-2753.

**Belanger A, Dextraze L, Nacro M, Samate AD, Collin G, Garneau FX, Gagnon H. (1994)** compositions chimiques d'huiles essentielles de plantes aromatiques du Burkina Faso, Actes des 13ièmes journées internationales des Huiles essentielles. Digue-les- Bains, France, 300-305.

**Béliveau R, Gingras D. (2005)** Les aliments contre le cancer. Édition du Trécarré, Outremont, 213.

**Bellakhdar J, Honda G, Miki, W. (1982)** Herb–Drugs and Herbalists in the Maghrib. Institute of the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Tokyo.

**Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Yaunos C. (1991)** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, ***35***, 123-143.

**Bellakhdar J. (1997)** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires-Saint-Etienne, Edition Ibis Press, 764.

**Ben Jemia M, Chaabane S, Senatore F, Bruno M, Kchouk ME.** (**2012**) Studies on the antioxidant activity of the essential oil and extract of Tunisian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. (Cupressaceae). *Natural Product Research*, ***27***, 1419-1430.

**Benali Toumi F, Benyahia M, Hamel L, Mohamedi H, Boudaghen L. (2011)** Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, ***158***, 93-100.

**Benhammou N, Atik-Bekkara F, Kadifkova Panovska T. (2007)** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf. *Advances in Food Sciences*, ***29 (3)***, 155-161.

**Benkhnigue O, Zidane L, Fadli M, Elyacoubi H, Rochdi A, Douira A. (2011)** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcelona*, ***53***, 191-216.

**Beylier-Maurel MF. (1976).** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana*, EPPOS, ***58***, 283-286.

**Bianchini A, Tomi F, Richomme P, Bernardini A-F, Casanova J. (2004)** Eudesm-5-en-11-ol from *Helichrysum italicum* essential oil. *Magnetic Resonance in Chemistry*, ***42***, 983-984.

**Bighelli A, Casanova J. (2009)** Analytical methods for *Cymbopogon* oils in essential oil bearing grasses, the genus *Cymbopogon*. Edition Taylor & Francis, London, 195-215.

**Blaise P, Wolff R, Farines M. (1997)** Etude régiospécifique de triacylglycérols d'huiles végétales par clivage chimique et RMN $^{13}$C haute-résolution. *OCL*, ***4***, 135-141.

**Blanc MC, Muselli A, Bradesi P, Casanova J. (2004)** Chemical composition and variability of the essential oil of *Inula graveolens* from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, ***19***, 314-319.

**Billot M, Wells FV. (1975)** Perfumery Technology. John Wiley & Sons Inc, New York.

**Bohra PM, Vaze AS, Pangarkar VG, Taskar A. (1994)** Adsorptive recovery of water soluble essential oil components. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, ***60,*** 97-102.

**Bouayad Alam S, Gaouar Benyelles N, Dib M. ElA, Djabou N, Tabti L, Paolini J, Muselli A, Costa J. (2014)** Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, ***87***, 56-61.

**Boudy P. (1950)** Economie forestière Nord Africaine. Tome II : monographies et traitement des essences forestières, Fasc. 2 : monographie et traitement du Thuya de Berbérie. Edition Larousse, 707-739.

**Boudy P. (1952)** Guide du forestier en Afrique du Nord. Édition Maison Rustique, Paris, 505.

**Bougatsos C, Ngassapa O, Runyoro DKB, Chinou IB. (2004)** Chemical Composition and *in vitro* Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Helichrysum* Species from Tanzania. *Z. Naturforsch.* ***59c***, 368-372.

**Bourkhiss B, Ouhssine M, Hnach M, Bourkhiss M, Satrani B, Farah A. (2007a)** Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, ***146***, 75-84.

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

**Bourkhiss B, Ouhssine M, Hnach M, Amechrouq A, Chaouch A, Satrani B. (2007c)** Composition chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Physical & Chemical News*, ***35***, 128-132.

**Bourkhiss M, Hnach M, Paolini J, Costa J, Chaouch A. (2009a)** Composition chimique des huiles essentielles de la sciure de bois et de feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, ***78***, 281-289.

**Bourkhiss M, Hnach M, Bourkhiss B, Ouhssine M, Chaouch A, Satrani B. (2009b)** Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata (Vahl)* Masters. *Journal of Agrosolutions*, ***20***, 44-48.

**Bourkhiss M, Hnach M, Lakhlifi T, Bourkhiss B, Ouhssine M, Satrani B. (2010a)** Production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, ***79***, 4-11.

**Bourkhiss M, Hnach M, Paolini J, Costa J, Farah A, Satrani B. (2010b)** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, ***79***, 141-154.

**Bourkhiss M, Hnach M, Lakhlifi T, Bouachrine M, Farah A, Satrani B, Ouhssine M, Chaouch A, Costa J. (2012)** Fractionnement et valorisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Phytothérapie*, ***10***, 222-228.

**Bourrel C, Dargent R, Vilrem G, Gaset A. (1995)** Analyse chimique et propriétés fongistatiques de quelques huiles essentielles en milieu liquide. Effet sur la morphogénèse hyphale. *Rivista italiana*, ***17***, 31-42.

**Boussaïd M, Bekhechi C, Beddou F, Chabane Sari D**, **Bighelli A, Casanova J, Tomi F. (2015)** Chemical Variability of the Essential Oil Isolated from Aerial Parts of *Tetraclinis articulata* from North-Western Algeria. *Natural Product Communications*, ***10 (8)***, 1447-1452.

**Boussaïd M, Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Paoli M**, **Casanova J, Tomi F. (2016)** Composition and Chemical Variability of the Cone Oil from Algerian *Tetraclinis articulata. Natural Product Communications*, ***11(8)***, 1167-1170.

**Bradesi P, Bighelli A, Tomi F, Casanova J. (1996)** L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13. *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*, partie 1, ***41***, 15-24, Partie 2, ***41,*** 41-50.

**Branen AL. (1975)** Toxicology and biochemistry of butylatedhydroxyanisole and butylatedhydroxytoluene. *Journal American Oil Chemists Society*, ***52***, 59-63.

**Bruins AP. (1979)** Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Analytical Chem*istry, ***51***, 967-72.

**Bruneton J. (1993)** Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. 2éme édition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 916.

**Bruneton J. (1999)** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3éme édition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120.

**Buchbauer G. (2010)** Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. *Edition of Taylor and Francis Group, LLC. United States of America*, 235-280.

**Buhagiar JA, Podesta MTC, Wilson AP, Micallef MJ, Ali S. (1999)** The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulata*. *Anticancer Research*, ***19***, 5435-5443.

**Buhagiar J, Podesta MTC, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. (2000)** Essential oil composition of different parts of *Tetraclinis articulata*. *Journal of Essential Oil Research*, ***12***, 29-32.

**Burt S. (2004)** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, ***94***, 223-253.

**Cabral C, Poc J, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Salgueiro L. (2015)** *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. *Industrial Crops and Products*, ***65***, 56-61.

**Caldefie-Chézet F, Guerry M, Chalchat JC, Fusillier C, Vasson MP, Guillot J. (2004)** Anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radical Research*, ***38***, 805-811.

**Caldefie-Chézet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP. (2006)** Potential anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytotherapy Research*, ***20***, 364-370.

**Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PV, Castillejos L, Ferret A. (2007)** Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, ***90***, 2580-2595.

**Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA. (2003)** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, ***87***, 215-220.

**Cannac M, Barboni T, Ferrat L, Bighelli A, Castola V, Costa J, Trecul D, Morandini F, Pasqualini V. (2009)** Oleoresin flow and chemical composition of Corsican pine (*Pinus nigra* subsp. *laricio*) in response to prescribed burnings. *Forest Ecology and Manag*ement, ***257***, 1247-1254.

**Cao G, Prior RL. (1998)** Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, ***44***,1309-1315.

**Carée P. (1953)** Précis de technologie et de chimie industrielle. T3. Edition de Ballière JB et fils.

**Carson CF, Hammer KA. (2011)** Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In Thormar H. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. United Kingdom, John Wiley et Sons LTD, 204-238.

**Castola V, Bighelli A, Casanova J. (1999)** Direct qualitative and quantitative analysis of triterpenes using $^{13}C$ NMR spectroscopy exemplified by dichloromethanic extracts of cork. *Applied Spectroscopy*, ***53***, 344-50.

**Castola V, Bighelli A, Rezzi S, Melloni G, Gladiali S, Desjobert JM, Casanova J. (2002)** Compostion and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork. *Industrial Crops and Products*, ***15***, 15-22.

**Castola V, Marongiu B, Bighelli A, Floris C, Laï A, Casanova J. (2005)** Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical $CO_2$ extracts. *Industrial Crops and Products*, ***21***, 65-69.

**Cavalli JF, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. (2004a)** Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and $^{13}C$-NMR: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochemical Analysis*, ***15***, 275-79.

**Cavalli JF, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. (2004b)** Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **42,** 709-711.

**Celiktas YO, Girgin G, Orhan H, Wichers HJ, Bedir E, Vardar Sukan F. (2007a)** Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times. *European Food Research and Technology*, ***224***, 443-451.

**Celiktas YO, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F. (2007b)** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, ***100***, 553-559.

**Chalchat JC, Garry RP, Michet A, Benjilali B, Chabat JL. (1993)** Essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain and France). *Journal of Essential Oil Research*, ***5***, 613-618.

**Chamblee TS, Karelitz RL, Radford T, Clark BC. (1997)** Identification of sesquiterpenes in *Citrus* essential oil by cryofocusing GC/FT-IR. *Journal of Essential Oil Research*, ***9***, 127-132.

**Chang ST, Chen PF, Chang SC. (2001)** Antimicrobial activity of leaf essential oil and their constituants from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, ***77***, 123-127.

**Changmann-Yoon SRM. (2011)** Repellency of lavender oil and linalool against spot clothing wax cicada, *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) and their electrophysiological responses. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, ***14***, 411-416.

**Chemat F. (2009)** Essential oils and aromas: Green extractions and Applications. HKB Publishers, Dehradun, 311.

**Chen Q, Gan Z, Zhao J, Wang Y, Zhang S, Li J, Ni Y. (2014)** *In vitro* comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) oils and their main components. *LWT-Food Science and Technology*, ***55***, 632-637.

**Chen W, Viljoen AM. (2010)** Geraniol : a review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, ***76***, 643-651.

**Chikhoune A, Hazzit M, Kerbouche L, Baaliouamer A, Aissat K. (2013)** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils : Chemical composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, ***25***, 300-307.

**Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. (1998)** Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, ***59***, 195-201.

**Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ. (2002)** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, ***79***, 213-220.

**Claridge TDW. (1999)** High-Resolution NMR techniques in organic chemistry. Tetrahedron organic chemistry. Elsevier, Oxford, ***19***, 382.

**Coleman WM, Gordon BM, Lawrence BM. (1989)** Examinations of the matrix isolation Fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII. *Journal Applied Spectroscopy*, ***43***, 298-304.

**Coleman WM, Lawrence BM. (1997)** A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, **12,** 1-8.

**Corcoran O, Spraul M. (2003)** LC–NMR–MS in drug discovery. *Drug Discovery Today*, ***8***,624-31.

**Corticchiato M, Casanova J. (1992)** Analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13 : application aux huiles essentielles. *Analysis*, **20,** 51-58.

**Corticchiato M, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. (1998)** Composition and intraspecific variability of essential oil from *Thymus herba-barona* Lois. *Biochemical Systematics and Ecology*, ***26,*** 915- 932.

**Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. (2000)** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal Applied Microbiology*, ***88,*** 170-175.

**Cremin P, Donnelly DMX, Wolfender JL, Hostettmann K. (1995)** Liquid Chromatographic-Thermospray Mass Spectrometric Analysis of Sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota: Basidiomycotina) species. *Journal of Chromatography A*, ***710***, 273-285.

**Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. (2003)** The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis cinera, Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis. Crop protection*, ***22***, 39-44.

**Dai J, Zhu L, Yang L, Qiu J. (2013)** Chemical composition, antioxydant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. *Journal of Experimental and Clinical Science*, ***12***, 479-490.

**Damjanović-Vratnica B, Perović A, Šuković D, Perović S. (2011)** effect of vegetation cycle on chemical content antibacterial activity of *Satureja montana* L. *Archives of Biological Science, Belgrade*, ***63 (4)***, 1173-1179.

**De Billerbeck VG, Roques C, Vaniere P, Marquier P. (2002)** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. *Hygiéne* (*Revue officielle de la société francaise d'hygiéne hospitaliére*), ***10***, 248-251.

**De Rosny LL. (1856)** Notice sur le Thuya de Barbarie : *Callitris Quadrivalvis*. Just Rouvier, Paris, 19.

**Deba F, Xuan TD, Yasudaa M, Tawata S. (2008)** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. radiata. *Food Control*, ***19***, 346–352.

**Defraigne J, Pincemail J. (2008)** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, ***63***,10-19.

**Delort E, Jaquier A. (2009)** Novel terpenyl esters from Australian finger lime (*Citrus australasica*) peel extract. *Flavour and Fragrance Journal*, ***24***, 123–32.

**De-Reynal B, Multon JL. (2009)** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 4ème edition Tec & Doc Lavoisier, Paris.

**Derome AE. (1987)** Modern NMR techniques for chemistry research. *Pergamon Press*: Oxford, 250.

**Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. (1993)** Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, ***48(4)***, 301-304.

**Djouahri A, Boudarene L. (2012)** Antioxidant and anti-inflamatory activity of methanolic, chloroform and ethyl acetate extracts of leaves *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters Algerian. *International Journal of Research in Pharmacology and Phytochemistry*, ***2(1)***, 7-11.

**Djouahri A, Boudarene L, Meklati BY. (2013a)** Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Industrial Crops and Products*, ***44***, 32-36.

**Djouahri A, Boudarene L, Sabaou N. (2013b)** Phytochemical Screening and Evaluation of Antimicrobial Activity of Crudes Extracts of Leaves *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters Algerian. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, ***5(1)***, 45-50.

**Djouahri A, Saka B, Boudarene L, Benseradj F, Aberrane S, Aitmoussa S, Chelghoum C, Lamari L, Sabaou N, Baaliouamer A. (2014)** In vitro synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. *Industrial Crops and Products*, **56**, 60-66.

**Djouahri A, Boualem S, Boudarene L, Baaliouamer A. (2015)** Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidantand anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Industrial Crops and Products* ***63***, 138–146.

**Djouahri A, Saka B, Boudarene L, Baaliouamer A. (2016)** Essential oil variability and biological activities of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters wood according to the extraction time. *Sous-press*.

**Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic, Zizic S, Kukic J. (2007)** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Journal of Ethnopharmacol*ogy, ***109***, 458-463.

**Dorman HJD, Deans SG. (2000)** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiol*ogy, ***88***, 308-316.

**Dugo P, Mondello L, Dugo L, Stancanelli R, Dugo G. (2000)** LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in *Citrus* essential oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *24*, 147-54.

**Duke JA, Beckstrom-Strenberg SM. (2001)** Handbook of medicinal mints (aromathematics) phytochemicals and biological activities. *Edition CRC Press*, Boca Raton.

**Duquesnoy E, Castola V, Casanova J. (2008)** Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using $^{13}$C NMR spectroscopy. *Carbohyd. Research*, ***343(5)***, 893-902.

**Duquesnoy E, Paoli M, Castola V, Bighelli A, Casanova J. (2009)** Identification of taxanes in extracts from leaves of *Taxus baccata* L. using $^{13}$C-NMR spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, ***20***, 246-252.

**Edris AE, Shalaby A, Fadel H. (2003)** Evaluation of a chemotype of spearmint *(Mentha spicata* L.) growing in Siwa Oasis. *Egyptian European Food Technology*, ***218***, 74-78.

**Edris AE. (2007)** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents. *Phytotherapy Research*, ***21***, 308-323.

**El amri J, Elbadaoui K, Zair T, bouharb H, chakir S, Alaoui TL. (2014)** Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatium* L. et l'extrait de Siléne vulgaris sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, ***82***, 7481-7492.

**El Bouhtoury-Charrier F, Hakam A, Famiri A, Ziani M, Charrier B. (2009)**Wood characterization of *Tetraclinis articulata* and evaluation of its resistance against lignilolytic fungi. *The International Research Group On Wood Protection*, Beijing, China.

**El-Ghorab AH, Shaaban HA, El-massry KF, Shibamoto T. (2008)** Chemical composition of volatile extract and biological activities of volatile and less-volatile extracts if Juniper berry (*Juniperus drupacea* L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***56***, 5021-5025.

**El-Haci IA, Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Mazari W, Gherib M, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. (2014)** Antimicrobial Activity of *Ammodaucus leucotrichus* Fruit Oil from Algerian Sahara. *Natural product Communications*, ***9***, 711-712.

**El-Haci IA. (2015)** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales endémiques du Sud de l'Algérie : *Ammodaucus leucotrichus* Coss. & Dur., *Anabasis aretioides* Moq. & Coss. et *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. Thése de doctorat en Science, Université de Tlemcen, Algérie, 188.

**El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Doukkali Z, Bouidida E H, Touati D, Nejjari R, El Guessabi L, Cherrah Y, Alaoui K. (2016)** Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetraclinis articulata* L. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *sous-press*.

**El Moussaouiti M, Talbaoui A, Gmouh S, Aberchane M, Benjouad A, Bakri Y, Kamdem DP. (2010)** Chemical composition and bactericidal evaluation of essential oil of *Tetraclinis articulata* Burl wood from Morocco. *Indian Academy of Wood Science*, ***7***, 14-18.

**Emberger L. (1938)** Les arbres au Maroc et comment les connaître. Vol I. Edition Larousse, Paris, 314.

**Erdogan Orhan İ, Ozcelik B, Kartal M, Kan Y. (2012)** Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal of Biology* , ***36***, 239-246.

**Farah A, Bouayoun T, Ghanmi M, El Bouri A, Bourkhiss B, Houari A, Satrani B. (2010)** Chemical constituents of essential oils of wood and wood veneers of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, ***13***, 420-425.

**Farjon A. (1998)** World Checklist and Bibliography of Conifers. In: Royal Botanic Gardens Press, Kew, London, 55-83.

**Farombi EO. (2003)** African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African Journal of Biotechnology*, ***2(12)***, 662-671.

**Felice S, Francesco N, Nelly AA, Maurezio B, Werner H. (2004)** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. *Flavour and Fragrance Journal*, ***20 (3)***, 291-294.

**Fennane M. (1989)** Esquisse des séries du thuya de bérbérie au Maroc. *Bulletin Institut de Science*, Rabat, ***13***, 77-83.

**Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. (2007)** Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: cold pressing: hydrodistillation and microwave dry distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, ***22***, 494-504.

**Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. (2010)** *Citrus* d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions. Edition Office des publications universitaires, Alger, 157.

**Fernandez X., Chemat F. (2012)** La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation. Vuibert, Paris, 288.

**Ferrari B, Tomi F, Casanova J. (2005)** Terpenes and acetylene derivatives from the roots of *Santolina corsica* (*Asteraceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, ***33***, 445-449.

**Ferreira MJP, Costantin MB, Sartorelli P, Rodrigues GV, Limberger R, Henriques AT, Kato MJ, Emerenciano VP. (2001)** Computer-Aided method for identification of components in essential oils by $^{13}$C NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, ***447***, 125-134.

**Filippi JJ, Belhassen E, Baldovini N, Brevard H, Meierhenrich UJ. (2013)** Qualitative and quantitative analysis of Vetiver essential oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, ***1288***, 127-148.

**Fillatre Y. (2011)** Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. Thèse de doctorat en science, Université Angers, 267.

**Fisher K, Phillips C. (2009)** *In vitro* inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of *Citrus* essential oils. *British Journal of Biomedical Science*, ***66***, 180-185.

**Flamini G, Cioni PL, Puleio R, Morelli I, Panizzi L. (1999)** antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phytotherapy Research*, ***13(4)***, 349-351.

**Formácek V, Kubeczka KH. (1982)** $^{13}$C NMR analysis of essential oils in aromatic plants: basic and applied aspects. Margaris N, Koedam A, Vokou D. Edition Martinus Nijhoff Publishers: La Haye, 177-181.

**Gao B, Chen Y, Zhang M, Xu Y, Pan S. (2011)** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Pericarpium Citri Reticulatae* essential oil. *Molecules*, ***16***, 4082-4096.

**Garcia C, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatzky C, Damonte B. (2003)** Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research*, ***17***, 1073-1075.

**Gaudy C, Buxeraud J. (2005)** Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Edition Elsevier Masson, 269.

**Gavliakova S, Biringerova Z. (2013)** Antitussive effects of nasal thymol challenges in healthy volunteers. *Journal of Respiratory Physiology & Neurobiology, **187**,* 104-107.

**Gazi MR, Kanda K, Yasuda M, Kato F. (2004)** Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *Sporobolomyces salmonicolor*. *Pakistan Journal of Biological Sciences, **7**,* 1365-1370.

**Gherib M, Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. (2016)** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Aerial Parts of Algerian *Pulicaria mauritanica*. *Natural Product Communications, **11**,* 109-112.

**Gill AO, Holley RA. (2004)** Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology, **70**,* 5750-5755.

**Gill AO, Holley RA. (2006)** Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology, **111**,* 170-174.

**Girennavar B, Jayaprakasha GK, Jadegoud Y, Nagana Gowda GA, Patil BS. (2007)** Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranyl coumarin from grapefruit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, **15(11)**,* 3684-3691.

**Goetz P, Ghedira K. (2012)** Phytothérapie anti-infectueuse. Edition Springer-Verlage, Paris, France, 382.

**Gonny M, Cavaleiro C, Salgueiro L, Casonova J. (2006)** Analysis of *Juniperus communis* subsp. *alpina* needle, berry, wood and root oils by combination of GC, GC/MS and $^{13}$C-NMR. *Flavour and Fragrance Journal, **21**,* 99-106.

**Greco J. (1966)** L'érosion, la défense et la restauration des sols, le reboisement en Algérie. Ministère de l'agriculture et de la réforme Agraire, 393.

**Guardabassi L, Courvalin P. (2006)** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In : Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press :Washington, 1-18.

**Günther H. (1994)** La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie. *Masson*, Paris, 557.

**Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. (2008)** The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology, **124**,* 91-97.

**Haddad A, Lachenal D, Marechal A, Kaid-Harche M, Janin G. (2006)** Caractéristiques papetières de la pâte de bois de thuya de Berbérie (Algérie) (*Tetraclinis articulata* Vahl) obtenue par un procédé soude-anthraquinone. *Annals of Forest Science, **63**,* 493-498.

**Hadjadj Aoual S. (2009)** Effet des facteurs environnementaux sur les premiers stades de la régénération naturelle de *Tetraclinis articulata* (Vahl, Master) en Oranie (Algérie). *Ecologia mediterranea*, ***35***, 20-31.

**Hala GM, Christ H, Carla K. (2000)** Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, ***71(3)***, 513-520.

**Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. (2007)** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, ***62 (10)***, 628-638.

**Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. (2000)** Terpinen-4-oI, the main component of the essential oil of *Malaleuca altemifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes**.** *Inflammation Research*, ***49***, 619-626.

**Hart KJ, Yanez-Ruitz DR , Duval SM, McEwan NR, Newbold CJ. (2008)** Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, ***147(1-3)***, 1-28.

**Heggers JP, Pelley RP, Robson MC. (1993)** Beneficial effects of *Aloe* in wound healing. *Phytotherapy Research*, ***7***, S47-S48.

**Herzi N, Camy S, Bouajila J, Destrac P, Romdhane M, Condoret JS. (2013)** Supercritical $CO_2$ extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, ***82***, 72-82.

**Hesse M, Meier H, Zeeh B. (2008)** Spectroscopic methods in organic chemistry. (2nd Ed.). *Thieme*, New-York, 453.

**Hmamouchi M. (1999)** Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie. Imprimerie de Fédala, Mohammedia (Maroc), 389.

**Hubert J. (2006)** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja : Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, 174.

**Huo M, Cui X, Xue J, Chi G, Gao R, Deng X, Guan S, Wei J, Soromou LW, Feng H, Wang D. (2013)** Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of Surgical Research*, ***180***, 47-54.

**Hyang-Sook C, Hee Sun S, Hiroyuki U, Masayoshi S. (2000)** Radical-Scavenging Activities of *Citrus* Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***48***, 4156-4161.

**Inouye S, Watanabe M, Nishiyama Y, Takeo K, Yamaguchi H. (1998)** Antisporulating and respiration-inhibitory effect of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses*, ***41***, 403-410.

**Iob A, Buenafe R, Abbas NM. (1998)** Determination of oxygenates in gasoline by FTIR. *Fuel Journal*, ***77***, 1861-1864.

**Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcucogluc M, Husnu Can BK. (2005)** Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, ***93***,551-556.

**Jaafari A, Mouse HA, Rakib EM, M'barek LA, Tilaoui M, Benbakhta C, Boulli A, Abbad A, Zyad A. (2007)** Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme, *Revista Brasileira de Farmacognosia* , ***17***, 477-491.

**Jafri MA, Farah, Javed K, Singh S. (2001)** Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb). *Journal of Ethnopharmacology*, ***75***, 89-94.

**Jamshidi R, Afzali Z, Afzali D. (2009)** Chemical composition of hydrodistillation essential oil of *rosemary* in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, ***5(1)***, 78-81.

**Jaset-Dongmo PM, Tatsadjieu NL, Tchinda Sonwa E, Kuate J, Amvam Zollo PH, Menut C. (2008)** Antiradical potential and antifungal activities of essentieal oils of the leaves of of *Eucalptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis. African Journal of Biotechnology*, ***7***, 4045-4050.

**Jennings W, Shibamoto T. (1980)** Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Jovanovich H.B. Edition, Academic Press, New York.

**Joulain D.** (**1994)** Methods for analyzing essential oils. Modern analysis methodologies: use and abuse. *Perfurmer & Flavorist*, **19,** 5-17.

**Joulain D, König WA. (1998)** The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E.B.-Verlag, Hamburg, 658.

**Ju JY, Polhamus C, Marr KA, Holland SM, Bennett JE. (2002)** Efficacies of Fluconozole, Caspofungin and Amphotericin B in *Candida glabrata* infected p 47-phox-1-knochout mice. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*, ***46***, 1240-1245.

**Juliano C, Mattana A, Usai M. (2000)** Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research*, ***12***, 516-522.

**Jung EK. (2009)** Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Chrysanthemum indicum* Against Oral Bacteria. *Journal of Bacteriology and Virology*, ***39(2)***, 61-69.

**Juteau F, Masotti V, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. (2002)** Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia*, ***73***, 532-535.

**Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. (1994)** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, ***76***, 626-631.

**Kalemba D, Kunicka A. (2003)** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry, **10**,* 813-829.

**Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H. (2006)** Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus: Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Medica, **72***, 1330-1334.

**Kiliç Ö. (2014)** Essential oil composition of two *Thuja* L. (Cupressaceae) species from Canada. *Muş Alparslan University Journal of Science, **2***, 195-199.

**Kim J, Marshall R, Wei C. (1995)** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, **43***, 2839-2845.

**Kivrak I, Duru ME, Ozturk M, Mercan N, Harmandar M, Topçu G. (2009)** Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia. Food Chemistry, **116**,* 470-479.

**Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, Weis N. (1989)** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research, **1**,*119-128.

**Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene YA, Millet J, Chaumont JP. (2004)** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire, **148**,* 202-206.

**Koechlin-Ramonatxo C. (2006)** Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme, **20**,*165-177.

**Koh KJ, Pearce AL, Marshman G, Finlay-Jones JJ, Hart PH. (2002)** Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British Journal of Dermatology, **147**,* 1212-1217.

**Kováts E. (1965)** Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography, **1***, 229-247.

**Kubeczka KH, Formácek V. (1984)** Application of direct carbone-13 NMR spectroscopy in the analysis of volatiles. Schreier P. Edition, Walter de Gruyter & Co., Berlin, New-York, 219-230.

**Kubeczka KH., Schultze W, Formácek V, Herres W. (1988)** New Developments in Essential Oils Analysis by Fourier-Transform Spectroscopy, 10th International Congress of Essential Oils, *Fragrances and Flavors*, Washington, 16-20 Nov 1986. Proceedings, Elsevier Science, 1988, 931-950.

**Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. (2004)** Analytical, nutritional and clinical methods use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry, **85***, 633-640.

**Lahlou M. (2004)** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research, **18***, 435-448.

**Lahsissene H, Kahouadji A, Tijane M, Hseini S. (2009)** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). Edition Lejeunia, ***186***, 1-27.

**Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE. (2001)** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiol*, ***91***, 453-462.

**Lange G, Schultze W. (1988)** Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in Bioflavour 87. Schreier P. Edition Walter de Gruyter & Co., Berlin, New-York, 115-122.

**Larabi F, Benhassaini H, Bennaoum Z. (2015)** Essential oil composition of *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters Leaves from Algeria. *International Journal of Herbal Medicine*, ***2 (6)***, 31-33.

**Le Floc'h E. (1983)** Contribution to ethnobotanical study of the flora of Tunisia. Program flora and vegetation in Tunisia. *Tunisian Scientific Publications, Printing officially the Republic of Tunisia*, 36-37.

**Leandro SM, Tiselius P, Queiroga H. (2006)** Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Marine Biology*, ***150***, 121-129.

**Leite AM, Lima EO, EL Souza, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. (2007)** Inhibitory effect of β-pinene, α-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, ***43(1),*** 121-126.

**Lemos MF, Lemos MF, Pacheco HP, Endringer DC, Scherer R. (2015)** Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*, ***70***, 41-47.

**Lesueur D, Bighelli A, Casanova J, Tran Minh Hoi and Tran Huy Thai (2009)** Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam. *Journal of Essential Oil Research*, ***21,*** 16-18.

**Letrech-Bellarouci N. (1991)** Les reboisements en Algérie et leur perspective d'avenir.. OPU, Alger, Volume I, 294.

**Levy SB, Marshall B. (2004)** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Journal of Nature Medicine*, ***10***, 122-129.

**Li Y, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. (2014)** Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. Springer Briefs in Molecular Science (1ère édition), Springer International Publishing, 71.

**Lin CT, Chen CJ, Lin TY, Tung JC, Wang SY. (2008)** Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. *Bioresource Technology*, ***99***, 8783-8787.

**Lindon JC, Nicholson JK, Wilson ID. (2000)** Directly coupled HPLC–NMR and HPLC–NMR–MS in pharmaceutical research and development. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, ***748***, 233-58.

**Lopez P, Sanchez C, Batle R, Nerin C. (2005)** Solid and vaporphase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***53 (17)***, 6939-6946.

**Maatoug M, Keller R, Benabdeli K, Dilem A. (2004)** Études microdensitométriques du bois de thuya de Maghreb *Tetraclinis articulata* Vahl Masters et effets des facteurs stationnels sur sa qualité. *Sciences* & Technologie, 19-28.

**Magiatis P, Skaltsounis AL, Chinou I, Haroutounian SA. (2002)** Chemical Composition and *in-vitro* Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Three Greek *Achillea* Species. *Z. Naturforsch*, ***57c***, 287-290.

**Mantle D, Anderton JG, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry EK. (1998)** Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, ***121***, 385-391.

**Marino M, Bersani C, Comi G. (1999)** Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*, ***62 (9)***, 1017-1023.

**Marouf A, Tremblin G. (2009)** Abrégé de biochimie appliqué. EDP Sciences, France, 490.

**Martin AR, Salgueiro LR, Goncalves MJ, Vila R, Tomi F, Adzet T, Casanova J. (2000)** Activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*. *Planta Medica*, ***66 (7)***, 647-650.

**Maruyama N, Sekimoto N, Ishibashi H. (2005)** Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, ***2***, 1-11.

**Masada Y. (1976)** Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. *John Wiley & sons*, New York.

**Masango P. (2005)** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J Clean Prod*, ***13***, 833-839.

**May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL. (2000)** Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, ***45***, 639-643.

**Mazzoni V, Bradesi P, Tomi F, Casanova J. (1997)** Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using $^{13}C$ NMR spectroscopy: application to honeys. *Magnetic Resonance in Chemistry*, ***35***, S81-S90.

**Mazzoni V, Tomi F, Casanova J. (1999)** A daucane type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***14(5)***, 268-272.

**Mc Lafferty FW, Stauffer DB. (1994)** Wiley Registry of Mass Spectral Data (6th Ed.), Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10 d. Palisade Co: Newfield.

**Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. (2008a)** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part I: Leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, ***20***, 32-38.

**Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. (2008b)** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part II: fruit oil. *Journal of Essential Oil Research*, ***20***, 104-107.

**Miguel MG. (2010)** Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils. *Molecules*, ***15***, 9252-9287.

**Milner JÂ. (2001)** A historical perspective on garlic and cancer: Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *Journal of Nutrition*, ***131***, 1027- 1031.

**Milner JÂ. (2006)** Preclinical perspectives on garlic and cancer: Signifiance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, ***136***, 827-831.

**Miyashita M, Sadzuka Y. (2013)** Effect of linalool as a component of *Humulus lupulus* on doxorubicin-induced antitumor activity. *Food and Chemical Toxicology*, ***53***, 174-179.

**Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. (2001)** The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry*, **57**, 65-69.

**Moghtader M, Afzali D. (2009)** Study of the antimicrobial proprieties of the oil of Rosemary. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, ***5 (3)***, 393-397.

**Mohan M, Haider SZ, Sharma A, Seth R, Sharma M. (2012)** Antimicrobial activity and composition of the volatiles of *Cinnamomum tamala Nees*. and *Murraya koenigii* (L.) Spreng. from Uttarakhand (India). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, S324-S327.

**Mondello L, Dugo P, Bartle KD. (1995)** Automated HPLC-HRGC: A Powerful Method for Essential Oil Analysis. Part V. Identification of Terpenes Hydrocarbons of Bergamot, Lemon, Mandarin, Sweet Orange, Bitter Orange, Grapefruit, Clementine and Mexican Lime Oils by Coupled HPLC-HRGC-MS (ITD). *Flavour and Fragrance Journal*, ***1,*** 33-42.

**Mroczek T, Ndjoko K, Glowniak K, Hostettmann K. (2004)** On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography–iontrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, ***1056,*** 91-97.

**Munari F, Dugo G, Cotroneo A. (1990)** Automated On-line HPLC-HRGC with Gradient Elution and Multiple GC Transfer Applied to the Characterization of *Citrus* Essential Oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, ***13***, 56-61.

**Muylaert A, Mainil JG. (2012)** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Annales de Médecine Vétérinaire*, ***156***, 109-123.

**N'Guyen TT, Duong T T, Bighelli A, Castola V, Muselli A, Richomme P, Casanova J. (2004)** *Baeckea frutescens* leaf oil from Vietnam : composition and chemical variability. *Flavour and Fragrance Journal*, ***19***, 217-220.

**Nakamura CV, Ishida K, Faccin LC, Filho BD, Cortez DG, Rozental S, Souza WD, Nakamura TU. (2004)** *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L., against four *Candida* species. *Research in Microbiology*, ***155***, 579-586.

**Nam AM. (2014)** Contribution de la RMN $^{13}C$ à l'analyse des huiles végétales, huiles essentielles et résines (*Olea europaea*, *Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*). Thèse de Doctorat, Université de Corse Pascal-Paoli, France, 186.

**NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2001)** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. NCCLS document M100- S11. USA: Villanova, ***21 (1)***.

**Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova M, Pulkraibek J. (2009)** Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, ***20***, 157-160.

**Negi PS, Jayaprakacha GK, Jagan Rao Mohan L, Sakariah KK. (1999)** Antibacterial activity of turmeric oil: a by product from curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***47***, 4297-4300.

**Novak P, Tepeš P, Fistrić I, Bratoš I, Gabelica V. (2006)** The application of LC-NMR and LCMS for separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, ***40***, 1268-1272.

**Núñez CV, Roque NF. (1999)** Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) sleumer (Meliaceae). *Journal of Essential Oil Research*, ***11,*** 439-440.

**Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ. (2010)** Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, ***120 (1)***, 308-312.

**Olufunke DM, Oladosu IA, Adeleke O, Ali MS. (2009)** Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of the aerial part of *Mezoneuron benthamianum* Baill. (Caesalpinoideae). *European Journal of Applied Science*, ***1 (3)***, 30-33.

**Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H. (2007)** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, ***18***, 1518-1523.

**Ottavioli J, Bighelli A, Casanova J. (2008)** Diterpene-rich needle oil of *Pinus pinaster* Ait. from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, ***23***, 121-125.

**Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Gabriel J, Piette P, Begin A. (1997)** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oil against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, ***37***, 155-162.

**Ouattara ZA, Boti JB, Ahibo AC, Casanova J, Tomi F, Bighelli A. (2013**) Analysis of *Cleistopholis patens* leaf and trunk bark oils using combined GC- Flame ionisation detection, GC-Retention Index, GC–MS and $^{13}$C-NMR. *Phytochemical Analysis*, ***24***, 574-580.

**Ouraini D, Agoumil A, Ismaili-Alaoui M, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M, Bellabas MA. (2005)** Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermaphytes. *Phytothérapie*, ***4***, 147-157.

**Oussou KR, Kanko C, Guessend N, Yolou S, Koukoua G, Dosso M, N'guessan YT, Figueredo G, Chalchat JC. (2004)** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Cote d'ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*, ***7 (10)***, 1081-1086.

**Oyaizu M. (1986)** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, ***103***, 413-419.

**Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev A. (2008)** Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, ***110***, 571-583.

**Ozturk M, Aydogmus-Ozturk F, Duru ME, Topçu G. (2007)** Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, ***103***, 623-630.

**Paolini J, Costa J, Bernardini AF. (2005)** Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, ***1076***, 170-78.

**Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. (2012)** Antimicrobial effect of linalool and terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, ***18 (3)***, 369-372.

**Pavlov A, Kovatcheva P, Georgiev V, Koleva I, Ilieva M. (2002)** Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Z. Naturforsch*, ***57***, 640-644.

**Pfaller MA, Messer SA, Karlsson Ă, Bolmström A. (1998)** Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *Journal of Clinical Microbiology*, ***36 (9)***, 2586-2589.

**Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO. (2002)** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, ***16***, 233-239.

**Politeo O, Jukic M, Milos M. (2006)** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croatica Chemica Acta*, ***79 (4)***, 545-552.

**Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS. (2007)** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, ***1163***, 2-24.

**Pusecker K, Albert K, Bayer E. (1999)** Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, ***836***, 245-252.

**Pyun MS, Shin S. (2006)** Antifungal effects of the volatile oils from *ASIium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils wih ketoconazole. *Phytomedicine*, ***13***, 394-400.

**Qadir M, Shah WA. (2014)** GC-MS analysis, antibacterial, antioxidant andanticancer activity of essential oil of Pinus roxburghii from Kashmir. *India International journal of research in pharmacy and chemistry*, ***4***, 228-232.

**Quézel P, Santa S.** (**1962**) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition CNRS, Tome I, Paris, 1091.

**Quézel P, Médail F.** (**2003**) Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen. Editions Technique et Documentation. Edition Lavoisier, 576.

**Rasooli I, Owlia P. (2005)** Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, ***66***, 2851-2856.

**Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, Ganai BA, Bhat KA, Anand R, Qurishi MA. (2012)** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine*, ***19***, 1185-1190.

**Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. (2002)** Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using $^{13}$C-NMR spectroscopy: Application to the analysis of oleoresin of *Pinus nigra*. *Applied Spectroscopy*, ***56***, 312–17.

**Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. (2005)** Composition and chemical variability of the oleoresin of *Pinus nigra* ssp. *laricio* from Corsica. *Industrial Crops and Products*, ***21***, 65-69.

**Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Thomazzi SM. (2012)** Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, ***143***, 656-663.

**Rossi PG. (2003)** Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des huiles essentielles. Université de Corse, 2.

**Ruberto G, Barrata MT. (2000)** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, ***69***, 167-174.

**Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJD. (2000)** Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica*, ***66***, 687-693.

**Runyoro D, Ngassapa O, Vagionas K, Aligiannis N, Graikou K, Chinou I. (2010)** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*, ***119***, 311-316.

**Sabu M, Kattan R. (2002)** Antidiabetic activity of medicinal plants and. its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacology*, ***81***, 155-160.

**Sacchi R, Addeo F, Giudiccianni I, Paolillo L. (1992)** Analysis of the positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by high-resolution $^{13}C$ *NMR* of the carbonyl region. *Italian Journal of Food Science*, ***2***, 117-24.

**Sadaka F, Nguimjeu C, Brachais CH, Vroman I, Tighzert L, Couvercelle JP. (2013**) Withdrawn: review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, ***20***, 350.

**Safaei-Ghomi J, Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. (2009)** GC/MS analysis and *in vitro* antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, ***115***, 1524-1528.

**Saleh MA, Clark S, Woodard B, Deolu-Sobogun SA. (2010)** Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethnicity & Disease*, ***20 (S1)***, 78-82.

**Salgueiro L, Vila R, Tomas X, Tomi F, Cañigueral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. (1995)** Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochem*istry, ***38***, 391-396.

**Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Figueiredo AC, Barroso JG, Cañigueral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. (1997a)** Variability of the essential oil of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry*, ***45***, 307-311.

**Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Tomas X, Cañigueral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. (1997b)** Composition and intraspecific variability of the essential oil of *Thymus camphorates*. *Phytochemistry*, **45**, 1177-1183.

**Salhi S, Fadli M, Zidane L, Douira A. (2010**) Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa*, ***31***, *133-146.*

**Sandra P, Bicchi C. (1987)** Chromatographic methods-Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, Heidelberg, Verlag, New York.

**Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. (2001)** Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, ***34***, 3-21.

**Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans J, Reglero G. (2006)** Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of optimal extraction parameters. *Journal of Food Protection*, ***69***, 369-375.

**Šarac Z, Matejić JS, Stojanović-Radić ZZ, Veselinović JB, Džamić AM, Bojović S, Marin PD. (2014)** Biological activity of *Pinus nigra* terpenes-Evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Computers in Biology and Medicine*, ***54***, 72-78.

**Satrani B, Farah M, Talbi M. (2004)** Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite du bois de *Tetraclinis articulata* du Maroc. *Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique*, ***964***, 75-84.

**Schnitzler P, Schon K, Reichling J. (2001)** Antiviral activity of Australian tea oil and *Eucalyptus* oil against *herpes simplex* virus in cell culture. *Phamazie*, ***56 (4)***, 343-347.

**Schuhmacher A, Reichling P. (2003)** Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses *Herpes simplex* Virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine*, ***10 (6-7)***, 504-510.

**Schultze W, Lange G, Schmaus G. (1992)** Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flavour and Fragrance Journal*, ***7***, 55-64.

**Sell CS. (2006)** The Chemistry of Fragrance From Perfumer to Consumer. 2nd edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 329.

**Shama H, Mohamed R, Zakaria H, Badr S, Mohamed GH, Mustapha ELA. (2011)** Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha Pulegium 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*, ***80***, 824- 836.

**Shin S, Kim JH. (2005)** *In vitro* inhibitory activities of essential oils from two *Korean Thymus* species against antibiotic-resistant pathogens. *Archives of Pharmacal Research*, ***28***, 897-901.

**Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. (2005)** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum. Journal of Ethnopharmacology*, ***96***, 151-158.

**Siani AC, Ramos MF, Menezes-de-Lima OJR, Dos-Santos RB, Fernadez-Ferreira, Soares RO, Rosas EC, Susunaga GS, Guimaraes AC, Zoghbi MG, Henriques MG. (1999)** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, ***66***, 57-69.

**Siddiqui YM, Ettayebi M, Haddad AM, Al-Ahdal MN. (1996)** Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on *Herpes simplex v*irus type 1 and Nawcastle disease virus. *Medical Science Research*, ***24***, 185-186.

**Silva J, Abebe W, Sousa SM, Duarte VG, Machado MI, Matos FJ. (2003)** Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, ***89***, 277-283.

**Singh SB, Barrett JF. (2006)** Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, ***71***, 1006-1015.

**Singh P, Shukla R, Prakash B, Kumar A, Singh S, Mishra PK, Dubey NK. (2010)** Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology International Journal*, ***48***, 1734-1740.

**Singh HP, Kaur S, Negi K, Kumari S, Saini V, Batish DR, Kohli RK. (2012)** Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon scented Eucalyptus; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT-Food Science and Technology*, ***48***, 237-241.

**Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Sokovic M. (2003)** Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight Stachys species from Greece. *Phytochemistry*, ***64***, 743-752.

**Sliti S, Ayadi S, Dumarçay S, Khouja MA, Gérardin P, André E, Perrin D, Abderrabba M. (2016)** Evaluation of essential oil composition and antioxidant capacity of hydromethanolic extracts of *Tetraclinis articulata*, depending on location and seasonal variations. *Journal of Materials and Environmental Science*, ***7 (3)***, 968-980.

**Smallfield B. (2001)** Defining North Island manuka chemotype resources. *Journal of medicinal plant*, ***9***, *14-20.*

**Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. (1998)** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, ***26***, 118-122.

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

**Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, Sokmen M, Sahin F. (2004)** The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius. Food Control*, ***15***, 627-634.

**Soković M, Van Griensven LJLD. (2006)** Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, ***116***, 211-224.

**Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR. (2006)** Antimicrobial Activity of Six Constituents of Essential Oil from *Salvia. Z. Naturforsch*, ***61c***, 160-164.

**Soussy CJ. (1997)** Etat actuel de la résistance aux antibiotiques. *Médecine Thérapeutique*, ***3***, 53-45.

**Stojković D, Soković M, Glamočlija J, Džamić A, Ćirić A, Ristić M, Grubišić D. (2011)** Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry*, ***128***, 1017-1022.

**Sutour S, Tomi F, Bradesi P, Casanova J. (2011)** Chemical composition of the essential oil from Corsican *Mentha aquatic* combined analysis by GC(RI), GC-MS and $^{13}C$ *NMR* spectroscopy. *Natural Product Communications*, ***6***, 1-4.

**Svoboda KP, Hampson JB. (1999)** Bioactivity of essential oils of selected Temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activies. Plant biology department, SAC auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA65HW , 17.

**Tabanca N, Kirimer N, Demirci F, Baser KH. (2001)** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristana subsp. phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***49***, 4300-4303.

**Tantaoui-Elaraki ANL. (1993)** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus broussonettii*, *T. zygis* and *T. satureioides*. *Journal of Essential Oil Research*, ***5***, 45-53.

**Teixeira Duarte MC, Mara Figueira G, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. (2005)** Anticandida activity of Brazilian medecinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, ***97 (9)***, 305-311.

**Tékaya-Karoui A, Ben Jannet H, Mighri Z. (2007)** Essential oil composition of terminal branches, cones and roots of *Tetraclinis articulata* from Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, ***10***, 2495-2499.

**Tékaya-Karoui A, Boughalleb N, Hammami S, Ben Jannet H, Mighri Z. (2011)** Chemical composition and antifungal activity of volatile components from woody terminal branches and roots of *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters growing in Tunisia. *African Journal of Plant Science*, ***5***, 115-122.

**Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferara D, Polission M, Sokmen A. (2005)** Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*, ***66***, 447-454.

**Tepe B, Sihoglu-Tepe A, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. (2007)** Chemical composition and activity of the essential oil *Clinopodium vulgare* L. *Journal of Food Chemistry*, ***103***, 766-770.

**Thomaidis NS, Georgiou CA. (1999)** Edible oil analysis by flow injection. *Laboratory Automation & Information Management*, ***34***, 101-114.

**Thompson J D, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. (2003)** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essenial oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, ***29***, 859-880.

**Tian J, Zeng X, Lü A, Zhu A, Peng X, Wang Y. (2015)** Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes, *LWT-Food Science and Technology*, ***60***, 63-70.

**Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J. (2010)** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomédecine*, ***17***, 142-145.

**Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V. (2005)** Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, ***89***, 549-554.

**Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. (1995)** Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, ***1***, 25-34.

**Tomi F, Casanova J. (2006)** $^{13}$C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae, A review. *Acta Horticulturae*, **723,** 185-192.

**Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. (2005)** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, ***49***, 2474-2478.

**Tzakou O, Verykokidou E, Roussis V, Chinou I. (1998**) Chemical composition and antibacterial properties of *Thymus longicaulis* subsp. *chaoubardii* oils: Three chemotypes in the same population. *Journal of Essential Oil Research*, ***10***, 97-99.

**UICN-Med, Agir. (2011)** Le Thuya de Berbérie : Découvre la biodiversité du Parc National d'Al Hoceima. UICN, Gland, Suisse et Malaga, Espagne.

**Ultee A, Gorris LMG, Smid EJ. (1998)** Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, ***85***, 211-218.

**Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ. (2000)** Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, ***63 (5)***, 620-624.

**Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. (2002)** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, ***68***, 1561-1568.

**Unlu M, Daferera D, Donmez E, Polissiou M, Tepe B, Sokmen A. (2002)** Composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacol*ogy, ***83***, 117-121.

**Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. (2009)** Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, ***7 (1)***, 65-74.

**Vagionas K, Graikou K, Ngassapa O, Runyoro D, Chinou I. (2007)** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. Food *Chemistry*, ***103***, 319-324.

**Van Bruijnsvoort M, Ottink SM, Jonker KM, de Boer E. (2004)** Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, ***1058***, 137-142.

**Van den Dool H, Kratz PD. (1963)** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, ***11***, 463-471.

**Vardar-Unlu G, Candan F, Sokmen A, Daferera D, Polissiou M, Sokmen M, Donmez E, Tepe B. (2003)** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. & Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***51***, 63-67.

**Vellutini M, Baldovini N, de Rocca Serra D, Tomi F, Casanova J. (2005)** β-Cyclolavandulyl and β-isocyclolavandulyl esters from *Peucedanum paniculatum* L., an endemic species to Corsica. *Phytochemistry*, ***66***, 1956-1962.

**Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. (2010)** Metabolomics: will it stay? *Phytochemical Anal*ysis, ***21,*** 2-3.

**Victoria M, Elipe S. (2003)** Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta*, ***497***, 1-25.

**Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC**. **(2007)** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, ***71,*** 230-235.

**Vogler BK, Ernst E. (1999)** *Aloe vera*: A systematic review of its clinical effectiveness. *Britich Journal of General Practice*, ***49***, 823-828.

**Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. (2003)** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, ***94***, 240-247.

**Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. (2005)** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, ***76***, 233-236.

**Wattanasatcha A, Rengpipat S, Wanichwecharu S. (2012)** Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, ***434***, 360-365.

**Wei A, Shibamoto T. (2010)** Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***58***, 7218-7225.

**Wenqiang G, Shufen L, Ruixiang Y, Shaokun T, Can Q. (2007)** Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chemistry*, ***101***, 1558-1564.

**Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. (1996)** New sesquiterpene ethers from vetiver oil. *Liebigs Annalen*, ***7***, 1195-1199.

**Weyerstahl P, Schlicht V. (1997a)** Synthesis of rac-bisabola-3(15), 10-dien-7-ol. *Liebigs Annalen*, ***8***, 1789-1790.

**Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. (1997b)** New cis-eudesm-6-ene derivatives from vetiver oil. *Liebigs Annalen*, ***7***, 1783-1787.

**Weyerstahl P, Marschall H, Weirauch M, Thefeld K, Surburg H. (1998)** Constituents of commercial Labdanum oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***13***, 295-318.

**Weyerstahl P, Marschall H, Wahlburg HC, Christiansen C, Rustaiyan A, Mirdjalili F. (1999a)** Constituents of the essential oil of *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) boiss. from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, ***14***, 121-130.

**Weyerstahl P, Marschall H, Eckhardt A, Christiansen C. (1999b)** Constituents of commercial brazilian Lantana oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***14***, 15-28.

**Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. (2000a)** 1,7-Cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al, a sesquiterpene with a novel skeleton, and other sesquiterpenes from Haitian vetiver oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***15***, 61-83.

**Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. (2000b)** Analysis of the polar fraction of Haitian vetiver oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***15***, 153-173.

**Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D, Surburg H. (2000c)** Constituents of Haitian vetiver oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***15***, 395-412.

**Wichtl M, Anton R. (1999)** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique, officinale, science et thérapeutique. 3ème édition *Tec & Doc Lavoisier*, Paris, 936.

**Williamson M, Neuhaus D. (1989)** The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis. VCH Publishers, New York, 522.

**Wolfender JL, Ndjoko K, Hostettmann K. (1998)** LC/NMR in natural products chemistry. *Current Organic Chemistry*, ***2***, 575-596.

**Xu T, Gherib M, Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Casabianca H, Tomi F, Casanova J, Bighelli A. (2015)** Thymyl esters derivatives and a new natural product modhephanone from *Pulicaria mauritanica* Coss. (Asteraceae) root oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***30 (1)***, 83-90.

**Yan X, Murphy BT, Hammond GB, Vinson JA, Neto CC. (2002)** Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***50***, 5844-5849.

**Yang Z. (2006)** Online hyphenated liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry for drug metabolite and nature product analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, ***40***, 516-527.

**Ye H, Shen S, Xu J, Lin S, Yuan Y, Jones GS. (2013)** Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control*, ***34***, 619-623.

**Zhao X, Zeng J, Gao H, Wang Y. (2014)** Optimization and Composition of Volatile Oil from *Polygonatum odoratum* (Mill. Druce) using Supercritical Fluid Extraction. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, ***13 (3)***, 779-786.

**Zhiri A. (2006)** Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. Nutra News : Science, Nutrition, Prévention et santé. Edition de la Fondation pour le libre choix, 16.

**Zidane A, Tits M, Angenot L, Wauters JN, Frederich M, Dib I, Mekhfi H, Aziz M, Bnouham M, Legssyer A, Ziyyat A. (2014)** Phytochemical analysis of *Tetraclinis articulata* in relation to its vasorelaxant property. *Journal of Material Environmental Sciences*, ***5***, 1368-1375.

**Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. (1997)** Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, ***58***, 45-54.

**Zrira S, Benjilali B, Elamrani A.** (**2005**) Chemical composition of the sawdust oil of Moroccan *Tetraclinis articulata* Vahl. *Journal of Essential Oil Research*, ***17***, 96-97.

**Zupanc M, Prošek M, Dušan M. (1992)** Combined CI and EI mass spectra in the analysis of essential oils. *Journal of High Resolution Chromatography*, ***15***, 510-513.

# Annexes

**Annexe 1 : Composition chimique des huiles essentielles des 50 échantillons des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* récoltés dans huit stations**

| | | **Stations** | **Honaïne** | | | | **Sebdou** | | | | | | **Ouled Mimoun** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Composés** | **Ir[a]** | **Ir[p]** | **H1** | **H2** | **H3** | **H4** | **S5** | **S6** | **S7** | **S8** | **S9** | **S10** | **OM 11** | **OM 12** | **OM 13** | **OM 14** | **OM 15** | **OM 16** |
| Tricyclène | 922 | 1015 | 1,5 | 1,8 | 0,8 | 1,5 | 3,9 | 1,7 | 1,3 | 1,4 | 1,7 | 1,7 | 0,3 | 1,2 | 0,6 | 1,2 | 0,6 | 0,2 |
| α-Pinène | 932 | 1015 | **26,4** | **18,4** | **40,0** | **33,9** | **27,2** | **28,1** | **29,6** | **34,5** | **24,2** | **35,7** | **31,8** | **30,3** | **40,1** | **39,1** | **31,4** | **40,2** |
| Camphène | 945 | 1065 | 1,9 | 2,1 | 0,9 | 1,8 | 4,3 | 1,9 | 1,5 | 1,6 | 1,9 | 2,0 | 0,5 | 1,4 | 0,8 | 1,4 | 0,8 | 0,3 |
| Sabinène | 966 | 1123 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,3 |
| *β*-Pinène | 972 | 1112 | 0,8 | 0,5 | 1,1 | 0,9 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,5 | 0,8 | 0,9 | 0,7 | 0,9 | 1,0 | 0,7 | 0,9 |
| Myrcène | 982 | 1161 | **3,3** | **3,3** | **9,7** | **5,2** | **3,7** | **7,2** | **4,2** | **8,7** | **6,2** | **4,0** | **3,0** | **4,2** | **3,6** | **7,1** | **4,1** | **3,2** |
| δ-3-Carène | 1007 | 1149 | 0,2 | ------ | ------ | ------ | Tr | ------ | Tr | ------ | ------ | Tr | 0,8 | Tr | 1,0 | ------ | 0,1 | Tr |
| α-Terpinène | 1010 | 1181 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr |
| *p*-Cymène | 1013 | 1271 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 1,0 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Limonène | 1022 | 1202 | **7,9** | **11,1** | **6,4** | **11,0** | **11,7** | **8,6** | **7,5** | **7,3** | **7,6** | **6,2** | **6,5** | **10,1** | **8,8** | **12,5** | **12,2** | **4,2** |
| (*E*)-β-Ocimène | 1037 | 1250 | ------ | ------- | Tr | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | ------- | 0,3 | Tr | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| γ-Terpinène | 1049 | 1245 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,1 |
| *p*-Cyménène | 1074 | 1436 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,2 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | Tr |
| Terpinolène | 1080 | 1283 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 0,4 |
| α-Campholénal | 1105 | 1488 | 0,5 | 0,4 | 0,1 | Tr | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,7 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| Camphre | 1122 | 1514 | **17,2** | **26,0** | **2,9** | **4,2** | **29,7** | **6,6** | **4,4** | **3,6** | **8,5** | **16,4** | **1,6** | **3,9** | **2,2** | **2,6** | **1,6** | **0,5** |
| Trans-verbénol | 1124 | 1680 | 0,3 | ------- | 0,1 | ------- | ------- | 0,1 | 0,1 | ------- | 0,1 | 0,8 | 0,1 | ------- | ------- | Tr | 0,0 | ------ |
| Hydrate decamphène | 1133 | 1591 | 1,1 | 1,0 | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,6 | 0,8 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | Tr |
| Bornéol | 1150 | 1694 | **5,1** | **12,9** | **0,4** | **0,8** | **2,9** | **1,0** | **1,1** | **0,5** | **0,6** | **1,2** | **0,5** | **0,6** | **0,4** | **0,6** | **0,7** | **0,2** |
| Terpinéol-4 | 1162 | 1597 | 1,0 | 1,0 | 0,3 | 0,4 | 0,8 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,2 |
| α-Terpinéol | 1173 | 1691 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,7 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Acétate de bornyle | 1271 | 1579 | **24,5** | **4,2** | **12,5** | **25,0** | **6,0** | **26,7** | **26,1** | **21,9** | **29,3** | **16,7** | **18,1** | **26,6** | **12,3** | **21,4** | **19,7** | **5,3** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1333 | 1691 | 1,0 | 1,6 | 0,7 | 1,0 | 0,7 | 1,1 | 1,4 | 0,9 | 1,0 | 0,2 | 1,0 | 0,9 | 0,5 | 0,8 | 0,9 | 0,4 |
| α-Copaène | 1377 | 1491 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,6 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 1,7 | 0,6 | 1,1 | 0,4 | 0,8 | 1,4 |
| *(E)-β*-Caryophyllène | 1419 | 1595 | **Tr** | **2,4** | **5,9** | **7,0** | **1,1** | **3,0** | **6,5** | **7,3** | **6,1** | **1,4** | **2,5** | **4,3** | **6,5** | **1,8** | **5,3** | **9,6** |
| α-Humulène | 1447 | 1665 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | ------- | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,9 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,5 |
| γ-Muurolène | 1471 | 1684 | ------- | 0,1 | 0,3 | ------- | Tr | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | Tr | 0,5 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,7 | 0,8 |
| Germacrène D | 1477 | 1705 | **0,2** | **1,3** | **7,0** | **0,1** | **0,2** | **4,8** | **5,1** | **3,6** | **3,6** | **0,4** | **12,2** | **5,2** | **8,1** | **3,9** | **8,7** | **14,2** |
| α-Muurolène | 1494 | 1723 | Tr | 0,1 | 0,2 | ------- | ------- | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | ------- | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,5 |
| γ-Cadinène | 1507 | 1753 | Tr | 0,5 | 2,0 | ------- | 0,1 | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 3,2 | 0,5 | 0,6 | 0,3 | 1,3 | 2,4 |
| δ-Cadinène | 1515 | 1755 | 0,1 | 0,3 | 1,0 | 0,2 | 0,1 | 1,0 | 0,9 | 0,6 | 0,5 | 0,1 | 1,8 | 1,4 | 1,9 | 0,8 | 1,7 | 2,5 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Oxyde de caryophyllène | 1571 | 1976 | Tr | 2,1 | 0,4 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 1,1 | 0,5 | 0,7 | 1,0 | 0,2 | 0,5 | 0,7 | 0,1 | 0,4 | 0,9 |
| Oxyde de humulène | 1595 | 2032 | ------- | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | ------ | 0,1 | 0,1 | ------ | 0,1 | 0,1 |
| *Epi*- Cubénol | 1616 | 2057 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,5 | Tr | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 1,6 | 0,3 | 0,8 | 0,2 | 0,6 | 1,0 |
| τ-Cadinol | 1626 | 2162 | ------ | 0,1 | 0,3 | ------- | ------- | Tr | Tr | Tr | Tr | ------- | 0,5 | Tr | Tr | Tr | Tr | Tr |
| **Total (%)** | | | **96,0** | **95,0** | **95,6** | **96,7** | **96,7** | **97,0** | **95,8** | **96,8** | **96,7** | **95,2** | **94,9** | **96,2** | **95,1** | **99,1** | **95,1** | **94,8** |

**Annexe 1 : Composition chimique des huiles essentielles des 50 échantillons des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* récoltés dans huit stations (Suite)**

| | | **Stations** | **Beni Khellad** | | | | | | **Souk Tlata** | | | | | | **Ghazaouet** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Composés** | **Ir[a]** | **Ir[p]** | **BK 17** | **BK 18** | **BK 19** | **BK 20** | **BK 21** | **BK 22** | **ST 23** | **ST 24** | **ST 25** | **ST 26** | **ST 27** | **ST 28** | **G 29** | **G 30** | **G 31** | **G 32** | **G 33** |
| Tricyclène | 922 | 1015 | 2,1 | 2,1 | 2,0 | 0,9 | 1,8 | 2,3 | 1,9 | 2,0 | 2,4 | 1,2 | 0,9 | 0,8 | 1,5 | 1,8 | 3,1 | 1,3 | 0,8 |
| α-Pinène | 932 | 1015 | **25,7** | **32,7** | **41,6** | **45,6** | **37,2** | **17,3** | **34,8** | **32,0** | **14,2** | **46,8** | **56,5** | **28,1** | **49,0** | **26,7** | **23,3** | **21,5** | 12,4 |
| Camphène | 945 | 1065 | 2,2 | 2,1 | 2,1 | 1,0 | 1,8 | 2,4 | 1,9 | 2,2 | 2,4 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 1,6 | 1,9 | 3,2 | 1,6 | 1,4 |
| Sabinène | 966 | 1123 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,2 |
| *β*-Pinène | 972 | 1112 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,3 | 0,9 | 1,1 | 0,5 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,4 |
| Myrcène | 982 | 1161 | **2,6** | **1,6** | **2,4** | **3,4** | **5,2** | **2,9** | **3,2** | **7,0** | **2,3** | **3,4** | **2,3** | **3,0** | **2,3** | **3,1** | **2,4** | **7,5** | **2,7** |
| δ-3-Carène | 1007 | 1149 | Tr | 0,1 | 0,3 | Tr | Tr | ------ | 0,1 | ------ | 0,1 | 0,1 | 0,1 | ------ | 0,5 | 0,1 | Tr | ------ | 0,1 |
| α-Terpinène | 1010 | 1181 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| *p*-Cymène | 1013 | 1271 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,2 | 0,6 |
| Limonène | 1022 | 1202 | **8,0** | **5,2** | **5,9** | **7,5** | **5,6** | **8,2** | **6,5** | **9,6** | **5,4** | **4,9** | **5,8** | **8,6** | **4,5** | **4,5** | **7,2** | **11,4** | **6,2** |
| (*E*)-β-Ocimène | 1037 | 1250 | Tr | ------ | ------ | Tr | ------ | ------ | Tr | 0,2 | Tr | Tr | 0,1 | 0,2 | ------ | ------ | ------ | 0,1 | 0,1 |
| γ-Terpinène | 1049 | 1245 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
| *p*-Cyménène | 1074 | 1436 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| Terpinolène | 1080 | 1283 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |
| α-Campholénal | 1105 | 1488 | 0,4 | 0,8 | 0,7 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,7 | 0,8 | 0,3 | 0,2 | 1,2 |
| Camphre | 1122 | 1514 | **20,2** | **13,2** | **22,6** | **5,3** | **13,4** | **8,0** | **10,0** | **13,6** | **30,5** | **3,0** | **3,7** | **1,9** | **12,7** | **15,0** | **12,4** | **6,1** | 31,2 |
| Trans-Verbénol | 1124 | 1680 | 0,2 | 0,9 | 0,5 | 0,3 | 0,7 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,7 | 0,2 | 0,2 | ------ | 0,6 | 0,7 | 0,3 | 0,1 | 0,6 |
| Hydrate de Camphène | 1133 | 1591 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,3 | 0,6 | 0,9 | 0,7 | 0,5 | 1,2 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,5 | 0,8 | 0,7 | 0,5 | 1,2 |
| Bornéol | 1150 | 1694 | **1,4** | **2,0** | **2,7** | **1,7** | **1,1** | **2,6** | **1,3** | **5,5** | **0,9** | **0,8** | **1,1** | **0,8** | **3,9** | **5,5** | **7,0** | **3,7** | **6,6** |
| Terpinéol-4 | 1162 | 1597 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,9 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 1,0 |
| α-Terpinéol | 1173 | 1691 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,4 |
| Acétate de bornyle | 1271 | 1579 | **18,6** | **23,1** | **6,5** | **9,4** | **15,9** | **45,1** | **25,4** | **8,3** | **22,7** | **18,5** | **6,2** | **21,4** | **5,9** | **23,6** | **27,2** | **27,7** | **21,9** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1333 | 1691 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,8 | 0,6 | 1,2 | 0,9 | 0,5 | 0,5 | 1,2 | 0,6 | 0,8 | 0,6 | 1,0 | 0,9 |
| α-Copaène | 1377 | 1491 | 0,8 | 0,3 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 0,2 | 0,6 | 0,7 | 1,2 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (*E*)-*β*-Caryophyllène | 1419 | 1595 | **3,7** | **1,8** | **1,0** | **8,4** | **2,9** | **0,9** | **2,1** | **5,5** | **1,3** | **6,7** | **7,1** | **13,3** | **3,9** | **1,9** | **1,9** | **5,8** | **0,6** |
| α-Humulène | 1447 | 1665 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | ------ |
| γ-Muurolène | 1471 | 1684 | Tr | Tr | Tr | 0,1 | Tr | Tr | ------ | 0,1 | Tr | ------ | 0,1 | 0,3 | Tr | Tr | 0,1 | Tr | ------ |
| Germacrène D | 1477 | 1705 | **0,7** | **0,6** | **0,5** | **2,1** | **0,6** | **1,0** | **0,3** | **1,1** | **0,6** | **0,2** | **2,8** | **5,1** | **0,6** | **0,7** | **1,5** | **1,1** | **0,2** |
| α-Muurolène | 1494 | 1723 | Tr | Tr | ------ | 0,1 | Tr | Tr | Tr | Tr | Tr | Tr | 0,1 | 0,2 | Tr | Tr | 0,1 | Tr | Tr |
| γ-Cadinène | 1507 | 1753 | 0,2 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,2 | 0,1 | ------ | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 1,1 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,1 | 0,1 |
| δ-Cadinène | 1515 | 1755 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,6 | 1,0 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,1 |
| Oxyde de caryophyllène | 1571 | 1976 | 2,2 | 1,7 | 1,0 | 2,5 | 2,2 | 0,4 | 2,2 | 1,7 | 2,4 | 2,6 | 1,3 | 1,0 | 1,7 | 2,6 | 1,0 | 2,3 | 1,8 |
| Oxyde d'humulène | 1595 | 2032 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,3 |
| *Epi*-Cubénol | 1616 | 2057 | 0,7 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,6 | 0,5 | 0,8 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,5 | 0,2 |
| τ-Cadinol | 1626 | 2162 | Tr | Tr | Tr | 0,1 | Tr | ------ | ----- | ----- | ------ | ------ | Tr | 0,2 | ------ | ------ | Tr | Tr | Tr |
| **Total (%)** | | | **94,9** | **95,1** | **95,9** | **95,0** | **95,2** | **97,6** | **96,2** | **96,1** | **94,8** | **95,4** | **95,4** | **95,3** | **95,0** | **94,9** | **96,3** | **96,4** | **95,4** |

**Annexe 1 : Composition chimique des huiles essentielles des 50 échantillons des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Tetraclinis articulata* récoltés dans huit stations (Suite)**

| | **Stations** | | **Ghazaouet** | | **AïnKebira** | | | | | | | **Sabra** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Composés** | **Ir[a]** | **Ir[p]** | **G 34** | **G 35** | **AK 36** | **AK 37** | **AK 38** | **AK 39** | **AK 40** | **AK 41** | **AK 42** | **Sab 43** | **Sab 44** | **Sab 45** | **Sab 46** | **Sab 47** | **Sab 48** | **Sab 49** | **Sab 50** |
| Tricyclène | 922 | 1015 | 1,3 | 1,3 | 1,8 | 1,4 | 1,1 | 1,9 | 1,3 | 1,6 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,7 | 1,6 | 1,4 | 0,6 | 1,0 | 0,6 |
| α-Pinène | 932 | 1015 | **21,6** | **26,7** | **25,3** | **16,0** | **19,7** | **9,2** | **20,4** | **23,8** | **12,1** | **35,8** | **45,5** | **23,6** | **27,7** | **24,9** | **28,7** | **29,3** | **19,5** |
| Camphène | 945 | 1065 | 2,2 | 1,7 | 2,0 | 1,7 | 1,5 | 2,2 | 1,7 | 2,0 | 1,2 | 0,8 | 0,7 | 1,1 | 1,9 | 1,6 | 0,8 | 1,1 | 1,0 |
| Sabinène | 966 | 1123 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,4 |
| *β*-Pinène | 972 | 1112 | 0,6 | 0,8 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 1,1 | 1,2 | 0,7 | 0,8 | 0,6 | 1,0 | 0,9 | 0,5 |
| Myrcène | 982 | 1161 | **5,8** | **2,5** | **2,4** | **2,3** | **3,0** | **1,8** | **7,9** | **2,6** | **2,7** | **4,3** | **3,6** | **3,8** | **2,7** | **2,7** | **3,9** | **6,0** | **7,3** |
| δ-3-Carène | 1007 | 1149 | 0,1 | Tr | 0,1 | Tr | 0,1 | Tr | Tr | Tr | 0,1 | Tr | 0,3 | Tr | 0,1 | Tr | Tr | 0,4 | Tr |
| α-Terpinène | 1010 | 1181 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| *p*-Cymène | 1013 | 1271 | 0,9 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 0,6 | 0,3 |
| Limonène | 1022 | 1202 | **7,3** | **6,4** | **5,1** | **6,7** | **7,9** | **6,2** | **7,6** | **7,1** | **6,3** | **6,2** | **12,1** | **9,5** | **7,5** | **5,2** | **5,8** | **3,6** | **5,8** |
| (*E*)-β-Ocimène | 1037 | 1250 | Tr | Tr | ------ | ------ | ------ | ------ | ------ | ------ | ------ | Tr | 0,2 | Tr | ------ | ------ | Tr | ------ | Tr |
| γ-Terpinène | 1049 | 1245 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,4 |
| *p*-Cyménène | 1074 | 1436 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| Terpinolène | 1080 | 1283 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,5 |
| α-Campholénal | 1105 | 1488 | 1,4 | 0,3 | 1,3 | 0,5 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 0,6 | 0,9 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,8 | 0,7 | 0,1 | 1,6 | 0,5 |
| Camphre | 1122 | 1514 | **34,0** | **9,9** | **19,1** | **16,4** | **8,4** | **27,8** | **11,4** | **9,5** | **30,3** | **2,5** | **1,6** | **17,3** | **40,3** | **13,9** | **3,9** | **28,7** | **11,5** |
| Trans- Verbénol | 1124 | 1680 | 0,5 | 0,3 | 1,1 | 0,4 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,5 | 0,8 | Tr | ------ | 0,1 | ------ | 0,5 | ------ | 1,7 | 0,3 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hydrate decamphène | 1133 | 1591 | 0,9 | 0,6 | 1,0 | 1,2 | 0,8 | 1,5 | 0,8 | 1,0 | 1,5 | 0,1 | 0,1 | 0,9 | 1,0 | 1,0 | 0,3 | 0,9 | 0,7 |
| Bornéol | 1150 | 1694 | **7,5** | **5,8** | **5,0** | **4,1** | **3,3** | **11,0** | **2,4** | **3,6** | **8,2** | **0,6** | **0,2** | **2,7** | **2,7** | **0,5** | **2,5** | **3,2** | **6,3** |
| Terpinéol-4 | 1162 | 1597 | 0,8 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,8 | 1,1 | 0,8 | 0,8 | 1,2 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 0,3 | 0,9 | 0,7 |
| α-Terpinéol | 1173 | 1691 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 0,2 |
| Acétate de bornyle | 1271 | 1579 | **4,6** | **25,3** | **20,2** | **34,5** | **40,7** | **23,7** | **29,8** | **35,4** | **16,5** | **22,4** | **13,9** | **20,7** | **1,2** | **28,4** | **26,7** | **1,8** | **26,2** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1333 | 1691 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 1,0 | 1,5 | 0,9 | 1,0 | 0,8 | 1,4 | 1,6 | 0,7 | 1,5 | 0,8 | 1,2 | 1,0 | 0,8 | 1,9 |
| α-Copaéne | 1377 | 1491 | Tr | 0,5 | 0,3 | 0,2 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,2 | 0,6 | 1,0 | 0,3 | 0,3 |
| (*E*)-*β*-Caryophyllène | 1419 | 1595 | **0,8** | **6,0** | **1,0** | **1,8** | **0,2** | **0,6** | **3,5** | **0,8** | **1,8** | **7,3** | **2,5** | **4,7** | **0,9** | **2,5** | **7,9** | **1,2** | **3,6** |
| α-Humulène | 1447 | 1665 | ------ | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,6 | 1,3 | Tr | 0,1 | 0,3 | Tr | 0,1 |
| γ-Muurolène | 1471 | 1684 | ------ | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,4 | 0,2 | 0,1 | ------ | ------ | 0,2 | Tr | 0,1 |
| Germacrène D | 1477 | 1705 | **Tr** | **1,1** | **0,3** | **0,8** | **1,5** | **0,2** | **1,4** | **0,5** | **0,5** | **5,0** | **6,0** | **1,1** | **0,1** | **0,1** | **4,1** | **0,5** | **1,6** |
| α-Muurolène | 1494 | 1723 | Tr | Tr | Tr | Tr | 0,1 | ------ | 0,1 | Tr | Tr | 0,2 | 0,2 | Tr | ------ | ------ | 0,1 | Tr | 0,1 |
| γ-Cadinène | 1507 | 1753 | ------ | 0,1 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | 1,0 | 0,8 | 0,2 | ------ | 0,9 | 0,2 | 0,7 |
| δ-Cadinène | 1515 | 1755 | Tr | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 1,1 | 1,0 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,9 | 0,1 | 0,3 |
| Oxyde de caryophyllène | 1571 | 1976 | 1,8 | 2,3 | 1,5 | 2,2 | 0,2 | 1,6 | 1,6 | 0,8 | 2,5 | 1,0 | 0,4 | 2,3 | 1,8 | 2,4 | 0,7 | 2,8 | 2,7 |
| Oxyde d'humulène | 1595 | 2032 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | ------ | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,1 | 0,5 | 0,5 |
| *Epi*-Cubénol | 1616 | 2057 | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,7 | 0,4 | 0,2 | 0,7 | 1,1 | 0,3 | 0,4 |
| τ-Cadinol | 1626 | 2162 | ------ | ------ | ------ | Tr | Tr | ------ | Tr | ------ | ------ | 0,1 | 0,3 | 0,1 | ------ | ------ | 0,2 | ------ | 0,2 |
| **Total (%)** | | | **94,9** | **95,8** | **94,6** | **95,8** | **95,9** | **95,0** | **96,4** | **95,6** | **94,9** | **94,8** | **96,2** | **97,5** | **95,9** | **95,5** | **94,3** | **95,0** | **95,6** |

**Annexe 2 : Composition chimique des huiles essentielles de 12 échantillons de feuilles récoltées à partir d'un même pied de *Tetraclinis articulata* dans la station d'Aïn Kebira**

| **Composés** | **Ir[a]** | **Ir[p]** | **AK 37 Mars** | **AK 37 Avril** | **AK 37 Mai** | **AK37 Juin** | **AK37 Juillet** | **AK37 Août** | **AK37 Septembre** | **AK37 Octobre** | **AK37 Novembre** | **AK37 Décembre** | **AK37 Janvier** | **AK37 Février** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tricyclène | 919 | 1015 | 1,4 | 1,1 | 1,2 | 2,5 | 2,2 | 2,4 | 2,5 | 1,3 | 1,7 | 1,8 | 1,3 | 0,9 |
| α-Pinène | 930 | 1015 | **16,0** | **11,4** | **13,2** | **23,1** | **24,6** | **23,7** | **23,3** | **19,3** | **25,2** | **23,3** | **18,3** | **18,7** |
| Camphène | 942 | 1064 | 1,7 | 1,5 | 1,4 | 2,4 | 2,3 | 2,4 | 2,7 | 1,5 | 1,7 | 1,9 | 1,4 | 1,1 |
| Sabinène | 963 | 1121 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 |
| β-Pinène | 969 | 1111 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | **0,4** | 0,5 |
| Myrcène | 979 | 1163 | **2,3** | **1,7** | **1,2** | **1,7** | **1,4** | **1,7** | **1,5** | **2,7** | **2,8** | **2,9** | **2,2** | **2,6** |
| δ-3-Carène | 1007 | 1148 | Tr | Tr | 0,1 | Tr | --------- | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| α-Terpinène | 1009 | 1179 | 0,2 | 0,1 | ---------- | Tr | --------- | --------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | --------- |
| *p*-Cymène | 1013 | 1270 | 0,4 | 0,5 | 1,3 | 0,5 | 0,7 | 0,5 | 0,6 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Limonène | 1020 | 1200 | **6,7** | **5,8** | **8,6** | **6,1** | **5,9** | **6,3** | **6,5** | **7,7** | **8,6** | **8,6** | **8,1** | **9,7** |
| (*E*)-*β*-Ocimène | 1037 | 1249 | --------- | ---------- | ---------- | --------- | --------- | --------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | ---------- | --------- |
| γ-Terpinène | 1047 | 1243 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | --------- | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| *p*-Cyménène | 1076 | 1436 | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | Tr | Tr | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Terpinolène | 1082 | 1281 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| α-Campholénal | 1103 | 1488 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,7 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 |
| Camphre | 1120 | 1514 | **16,4** | **14,8** | **9,7** | **11,0** | **11,5** | **10,3** | **22,5** | **4,9** | **3,2** | **4,0** | **4,7** | **2,2** |
| Trans-verbénol | 1122 | 1681 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| Hydrate de camphène | 1131 | 1591 | 1,2 | 1,2 | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,9 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,2 |
| Bornéol | 1148 | 1696 | **4,1** | **6,1** | **6,5** | **4,7** | **5,4** | **5,0** | **12,0** | **2,5** | **1,8** | **2,0** | **2,6** | **1,8** |
| Terpinéol-4 | 1160 | 1597 | 1,0 | 0,9 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 |
| α-Terpinéol | 1170 | 1691 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Acétate de bornyle | 1269 | 1578 | **34,5** | **41,1** | **35,9** | **26,7** | **25,0** | **26,5** | **8,6** | **26,7** | **22,0** | **23,8** | **24,6** | **22,4** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1330 | 1691 | 1,0 | 1,2 | 1,0 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,9 | 1,1 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 1,0 |
| α-Copaène | 1373 | 1491 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,7 | 1,0 | 0,8 | 0,9 | 1,2 |
| Sibérène | 1397 | 1545 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,2 | 1,6 | 1,2 | 1,4 | 1,8 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (*E*)-*β*-Caryophyllène | 1415 | 1595 | 1,8 | 1,2 | 1,2 | 1,7 | 1,0 | 2,1 | 0,9 | 7,4 | 10,2 | 8,3 | 8,7 | 12,7 |
| α-Humulène | 1447 | 1665 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,2 | 2,0 | 2,4 | 2,0 | 2,2 | 3,1 |
| γ-Muurolène | 1468 | 1683 | 0,1 | Tr | 0 ,1 | 0,1 | Tr | --------- | ---------- | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
| Germacrène D | 1473 | 1703 | **0,8** | **0,5** | **0,4** | **0,6** | **Tr** | **0,8** | **0,1** | **4,0** | **3,5** | **3,9** | **4,1** | **5,7** |
| α-Muurolène | 1490 | 1722 | Tr | Tr | Tr | Tr | 0,1 | 0,1 | ---------- | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| γ-Cadinène | 1503 | 1752 | 0,4 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
| δ-Cadinène | 1511 | 1755 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,2 | 0,1 | 1,0 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 1,2 |
| Oxyde de caryophyllène | 1567 | 1974 | 2,2 | 3,1 | 4,3 | 2,3 | 2,4 | 2,0 | 1,4 | 2,2 | 1,3 | 1,4 | 2,9 | 1,5 |
| Oxyde d'humulène | 1591 | 2030 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,3 |
| *Epi*-Cubénol | 1612 | 2056 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 0,7 | 0,7 |
| τ-Cadinol | 1622 | 2162 | Tr | Tr | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr |
| **Total (%)** | | | **96,6** | **97,1** | **92,8** | **90,2** | **89,0** | **90,6** | **89,7** | **91,3** | **92,7** | **91,6** | **90,2** | **92,0** |

**Annexe 3 : Composition chimique des huiles essentielles de 40 échantillons de cônes de *Tetraclinis articulata* récoltés dans huit stations**

| | | **Stations** | **Souk Tlata** | | | | | **Sabra** | | | | | **AïnKebira** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Composés** | **Ir[a]** | **Ir[p]** | **ST 1** | **ST 2** | **ST 3** | **ST 4** | **ST 5** | **Sab 6** | **Sab 7** | **Sab 8** | **Sab 9** | **Sab 10** | **AK 11** | **AK 12** | **AK 13** | **AK 14** | **AK 15** |
| Tricyclène | 918 | 1016 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| α-Pinène | 929 | 1016 | **69,1** | **72,8** | **70,8** | **64,0** | **70,3** | **62,4** | **61,9** | **64,3** | **61,7** | **47,1** | **65,7** | **73,6** | **71,1** | **71,5** | **65,0** |
| Camphène | 941 | 1063 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Sabinène | 962 | 1121 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,5 | 0,4 | 0,8 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,5 |
| β-Pinène | 968 | 1110 | **1,7** | **1,8** | **1,8** | **1,5** | **2,5** | **2,0** | **1,8** | **1,5** | **1,7** | **1,6** | **2,0** | **1,8** | **1,9** | **1,6** | **1,5** |
| Myrcène | 978 | 1159 | **4,0** | **4,9** | **5,0** | **2,4** | **2,4** | **11,6** | **9,6** | **3,1** | **4,8** | **6,1** | **7,9** | **4,8** | **3,7** | **2,9** | **4,9** |
| δ-3-Carène | 1003 | 1147 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 0,3 |
| α-Terpinène | 1006 | 1179 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | -------- | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| *p*-Cymène | 1009 | 1269 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Limonène | 1019 | 1200 | **9,2** | **8,6** | **11,4** | **13,4** | **8,5** | **9,2** | **6,5** | **15,8** | **7,5** | **6,9** | **6,9** | **8,7** | **9,2** | **10,1** | **11,2** |
| *β*-Phellandrène | 1019 | 1209 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| γ-Terpinène | 1046 | 1243 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Terpinolène | 1076 | 1281 | **0,5** | **0,6** | **1,0** | **0,4** | **0,5** | **0,9** | **0,5** | **0,4** | **0,2** | **0,5** | **0,7** | **0,5** | **0,5** | **0,4** | **0,4** |
| α-Campholénal | 1102 | 1489 | **0,8** | **0,3** | **0,3** | **1,4** | **1,0** | **Tr** | **0,8** | **0,5** | **0,2** | **0,4** | **0,6** | **0,5** | **0,5** | **1,0** | **1,7** |
| Camphre | 1118 | 1514 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 |
| Trans-pinocarvéol | 1120 | 1651 | **0,5** | **0,1** | **0,2** | **0,8** | **0,4** | **0,1** | **0,3** | **0,1** | **0,1** | **0,2** | **0,2** | **0,2** | **0,2** | **0,6** | **0,8** |
| Trans-verbénol | 1125 | 1674 | 0,8 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,8 |
| Bornéol | 1146 | 1996 | Tr | -------- | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | Tr | Tr | Tr | 0,1 | 0,1 |
| Terpinéol-4 | 1159 | 1598 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| α-Terpinéol | 1169 | 1996 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Perrilaldéhyde | 1242 | 1784 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | Tr | ------ | Tr | 0,1 |
| Acétate de bornyle | 1266 | 1576 | **1,0** | **0,8** | **0,9** | **1,7** | **1,7** | **1,1** | **1,7** | **1,8** | **1,4** | **2,4** | **2,4** | **0,8** | **1,1** | **1,0** | **1,6** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1329 | 1691 | **1,4** | **1,1** | **0,5** | **1,5** | **0,5** | **1,4** | **1,7** | **1,7** | **1,8** | **2,1** | **1,8** | **0,8** | **1,1** | **1,2** | **1,6** |
| α-Copaène | 1372 | 1486 | **Tr** | **Tr** | **0,2** | **0,2** | **0,2** | **0,2** | **0,5** | **0,2** | **0,2** | **1,1** | **0,4** | **0,5** | **0,8** | **0,3** | **0,2** |
| *β*-Elèmène | 1384 | 1584 | Tr | Tr | Tr | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | Tr | -------- | Tr | Tr |
| Sibérène | 1396 | 1545 | **0,1** | **Tr** | **0,3** | **0,3** | **0,4** | **0,2** | **0,7** | **0,3** | **0,4** | **1,7** | **0,6** | **0,8** | **1,3** | **0,4** | **0,3** |
| *(E)-β*-Caryophyllène | 1413 | 1591 | **0,7** | **0,7** | **0,7** | **0,5** | **0,2** | **1,3** | **1,9** | **0,2** | **5,7** | **6,3** | **0,1** | **0,3** | **0,2** | **0,9** | **0,3** |
| α-Humulène | 1446 | 1662 | **0,2** | **0,2** | **0,3** | **0,2** | **Tr** | **0,4** | **0,5** | **0,1** | **1,9** | **1,7** | **Tr** | **0,1** | **0,1** | **0,2** | **0,1** |
| γ-Muurolène | 1466 | 1681 | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | Tr | Tr | Tr | 0,1 |
| Germacrène D | 1472 | 1702 | **1,5** | **1,8** | **1,4** | **0,7** | **1,3** | **3,2** | **1,9** | **1,7** | **1,8** | **6,1** | **2,3** | **0,7** | **0,9** | **0,6** | **1,0** |
| γ-Cadinène | 1502 | 1752 | **1,3** | **1,2** | **0,7** | **0,4** | **0,8** | **1,1** | **1,4** | **1,5** | **2,0** | **3,4** | **0,5** | **0,5** | **0,7** | **0,1** | **0,4** |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| δ-Cadinène | 1510 | 1750 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| α-Cadinène | 1525 | 1780 | Tr | Tr | Tr | ------- | ------ | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | Tr | -------- | Tr | -------- | Tr |
| Oxyde de caryophyllène | 1565 | 1974 | **0,3** | **0,1** | **0,1** | **0,7** | **0,1** | **Tr** | **0,5** | **0,1** | **1,7** | **1,8** | **0,1** | **Tr** | **0,1** | **0,3** | **0,2** |
| *Epi*-Cubénol | 1611 | 2056 | **Tr** | -------- | **0,1** | **0,2** | **0,1** | **0,1** | **0,3** | **0,1** | **0,2** | **1,0** | **0,2** | **0,3** | **0,5** | **0,2** | **0,2** |
| τ-Cadinol | 1620 | 2162 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | Tr | 0,1 |
| (*Z*)-Biformène | 1971 | 2312 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,8 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | 0,2 |
| (*E*)-Biformène | 1997 | 2357 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,2 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,6 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| **Total (%)** | | | **96,3** | **98,3** | **98,7** | **94,1** | **95,1** | **99,0** | **96,8** | **97,5** | **96,9** | **96,5** | **96,6** | **98,3** | **97,8** | **96,6** | **95,8** |

**Annexe 3 : Composition chimique des huiles essentielles de 40 échantillons de cônes de *Tetraclinis articulata* récoltés dans huit stations (Suite)**

| | | **Stations** | **Honaïne** | | | | | **Ouled Mimoun** | | | | | **Sebdou** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Composés** | **Ir[a]** | **Ir[p]** | **H 16** | **H 17** | **H 18** | **H 19** | **H 20** | **OM 21** | **OM 22** | **OM 23** | **OM 24** | **OM 25** | **S 26** | **S 27** | **S 28** |
| Tricyclène | 918 | 1016 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| α-Pinène | 929 | 1016 | **55,9** | **54,3** | **48,7** | **60,7** | **63,3** | **61,3** | **72,4** | **62,0** | **51,7** | **59,4** | **69,6** | **69,4** | **68,0** |
| Camphène | 941 | 1063 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Sabinène | 962 | 1121 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,9 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,9 | 0,9 | 0,8 |
| *β*-Pinène | 968 | 1110 | **1,9** | **1,6** | **1,6** | **1,5** | **1,7** | **1,8** | **1,8** | **1,6** | **1,3** | **1,3** | **1,8** | **1,7** | **1,9** |
| Myrcène | 978 | 1159 | **4,2** | **2,7** | **3,5** | **3,8** | **3,8** | **3,8** | **5,6** | **5,8** | **3,5** | **3,3** | **3,8** | **4,8** | **4,0** |
| δ-3-Carène | 1003 | 1147 | 0,3 | 0,1 | 0,5 | 0,4 | 0,7 | 0,2 | 1,4 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,4 |
| α-Terpinène | 1006 | 1179 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| *p*-Cymène | 1009 | 1269 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| Limonène | 1019 | 1200 | **11,5** | **18,2** | **18,4** | **10,1** | **9,7** | **16,8** | **7,3** | **14,9** | **17,2** | **13,9** | **15,4** | **14,6** | **13,0** |
| *β*-phellandrène | 1019 | 1209 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,5 |
| γ-Terpinène | 1046 | 1243 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Terpinolène | 1076 | 1281 | **0,5** | **1,0** | **0,4** | **0,5** | **0,9** | **0,6** | **1,3** | **0,5** | **0,8** | **0,3** | **0,9** | **0,9** | **0,8** |
| α-Campholénal | 1102 | 1489 | **0,8** | **0,4** | **0,5** | **0,4** | **0,4** | **1,0** | **0,1** | **1,1** | **0,6** | **1,0** | **0,1** | **0,1** | **0,1** |
| Camphre | 1118 | 1514 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | Tr |
| Trans-pinocarvéol | 1120 | 1651 | **0,5** | **0,2** | **0,3** | **0,2** | **0,3** | **0,4** | **0,1** | **0,6** | **0,3** | **0,4** | **0,1** | **0,1** | **0,1** |
| Trans-verbénol | 1125 | 1674 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,6 | 0,1 | 0,9 | 0,4 | 0,8 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Bornéol | 1146 | 1696 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | 0,2 | ------- | Tr | Tr |
| Terpinéol-4 | 1159 | 1598 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 |
| α-Terpinéol | 1169 | 1696 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | Tr | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,1 |
| Perrilaldéhyde | 1242 | 1784 | 1,0 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 |

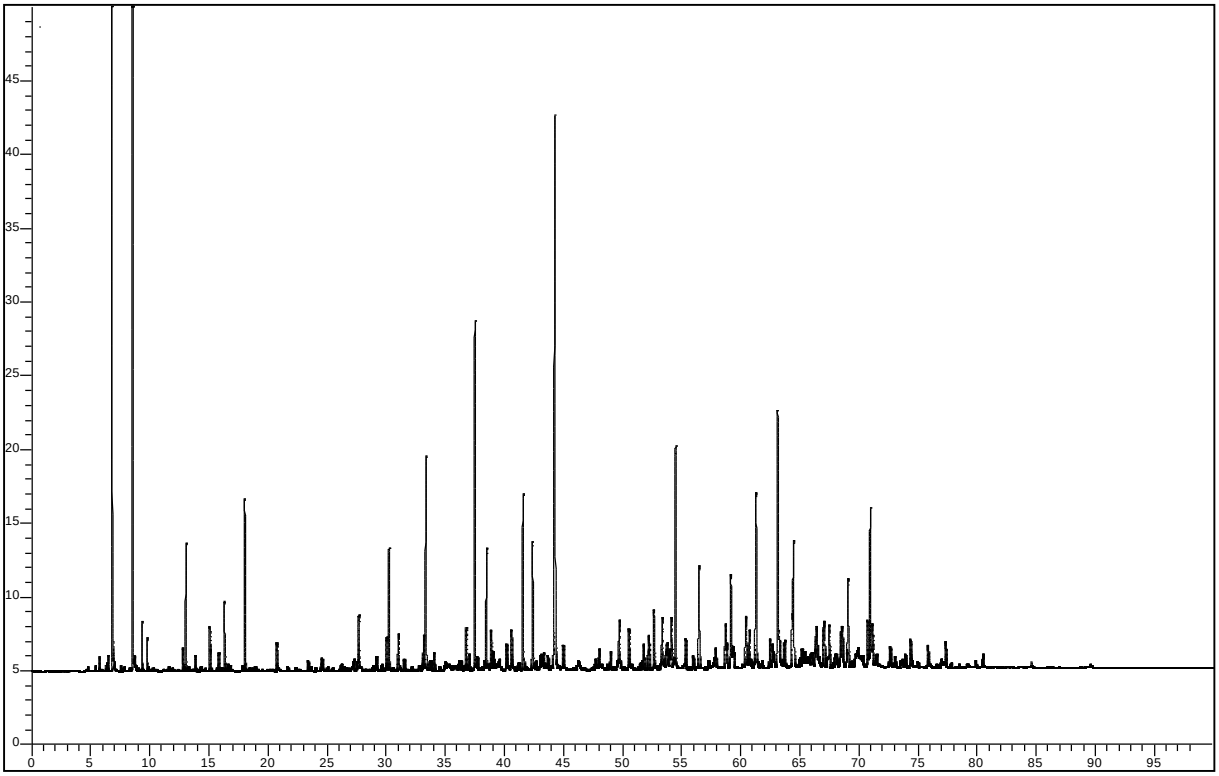
| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Acétate de bornyle | 1266 | 1576 | **2,5** | **1,5** | **2,0** | **1,8** | **1,6** | **2,4** | **0,8** | **1,1** | **1,7** | **1,4** | **0,9** | **0,8** | **1,5** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1329 | 1691 | **3,0** | **3,2** | **4,1** | **3,0** | **1,8** | **1,5** | **0,6** | **0,8** | **2,7** | **1,6** | **0,5** | **0,6** | **1,5** |
| α-Copaène | 1372 | 1486 | **0,2** | **0,2** | **0,6** | **0,5** | **0,3** | **0,3** | **0,3** | **0,1** | **0,4** | **0,2** | **0,1** | **0,1** | **0,1** |
| *β*-Elèmène | 1384 | 1584 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | --------- | 0,1 | Tr | 0,2 | 0,1 | 0,2 | Tr | 0,1 |
| Sibérène | 1396 | 1545 | **0,3** | **0,2** | **0,8** | **0,8** | **0,4** | **0,4** | **0,4** | **0,1** | **0,6** | **0,3** | **0,1** | **0,1** | **0,3** |
| *(E)-β*-Caryophyllène | 1413 | 1591 | **4,0** | **3,0** | **0,4** | **4,6** | **3,5** | **0,1** | **0,1** | **0,1** | **4,7** | **0,6** | **0,3** | **0,6** | **1,1** |
| α-Humulène | 1446 | 1662 | **1,1** | **0,8** | **0,1** | **1,3** | **1,0** | --------- | **Tr** | **Tr** | **1,2** | **0,2** | **0,1** | **0,2** | **1,6** |
| γ-Muurolène | 1466 | 1681 | Tr | 0,1 | 0,2 | Tr | Tr | **Tr** | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | ------- |
| Germacrène D | 1472 | 1702 | **0,4** | **1,7** | **3,3** | **1,0** | **1,4** | **1,0** | **2,2** | **1,4** | **3,4** | **1,4** | **1,5** | **1,5** | **0,7** |
| γ-Cadinène | 1502 | 1752 | **0,2** | **1,3** | **0,9** | **0,4** | **1,0** | **0,8** | **1,1** | **1,6** | **0,6** | **1,6** | **0,4** | **0,4** | **0,4** |
| δ-Cadinène | 1510 | 1750 | 0,1 | 0,1 | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| α-Cadinène | 1525 | 1780 | -------- | Tr | 0,1 | -------- | Tr | Tr | Tr | 0,1 | Tr | 0,1 | -------- | Tr | -------- |
| Oxyde de caryophyllène | 1565 | 1974 | **2,7** | **0,6** | **0,1** | **0,9** | **0,7** | Tr | **Tr** | **0,1** | **0,8** | **0,1** | ------- | **Tr** | **0,1** |
| *Epi*-Cubénol | 1611 | 2056 | **0,3** | **0,1** | **0,6** | **0,6** | **0,3** | **0,2** | **0,1** | **Tr** | **0,3** | **0,1** | **Tr** | ----- | **0,1** |
| τ-Cadinol | 1620 | 2162 | Tr | 0,2 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | Tr | Tr | Tr |
| (*Z*)-Biformène | 1971 | 2312 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 |
| (*E*)-Biformène | 1997 | 2357 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 |
| **Total (%)** | | | **95,0** | **96,1** | **92,9** | **96,7** | **97,1** | **97,1** | **98,5** | **96,0** | **96,8** | **91,4** | **99,0** | **99,0** | **98,8** |

**Annexe 3 : Composition chimique des huiles essentielles de 40 échantillons de cônes de *Tetraclinis articulata* récoltés dans huit stations (Suite)**

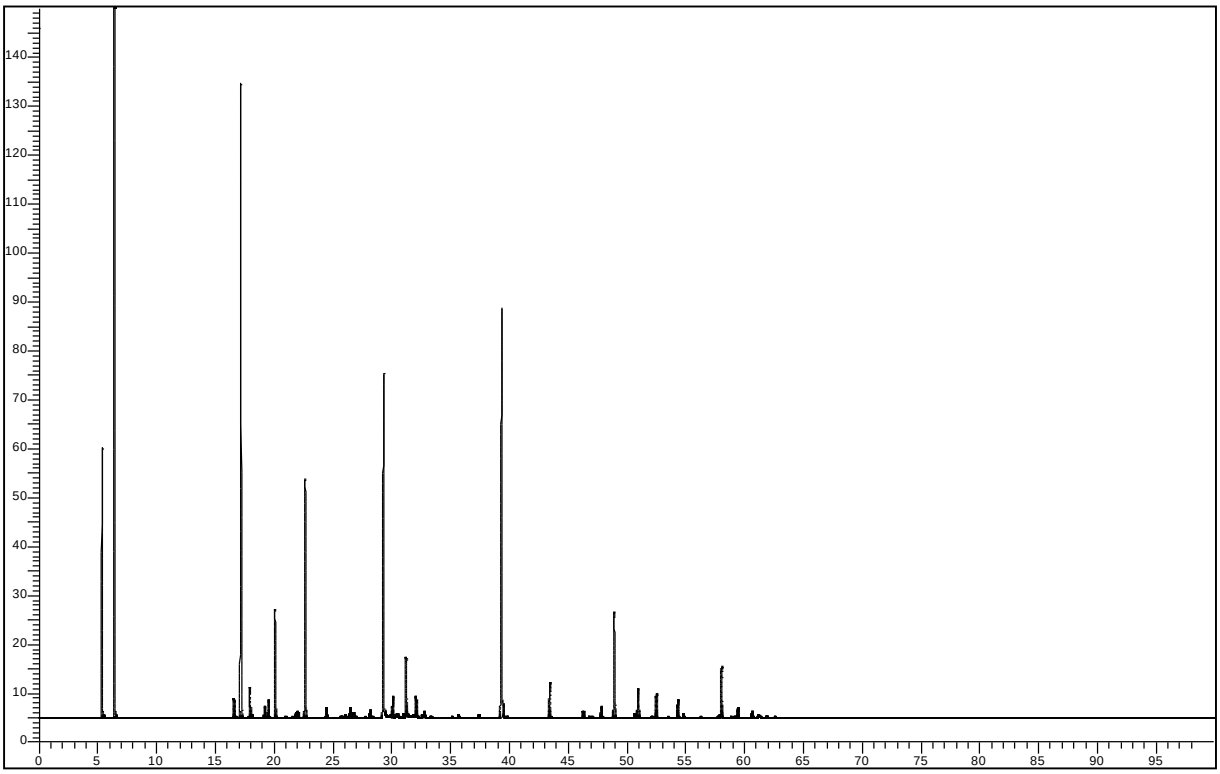
| | **Stations** | | **Sebdou** | | **Beni Khellad** | | | | | **Ghazaouet** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Composés** | **Ir[a]** | **Ir[p]** | **S 29** | **S 30** | **BK 31** | **BK 32** | **BK 33** | **BK 34** | **BK 35** | **G 36** | **G 37** | **G 38** | **G 39** | **G 40** |
| Tricyclène | 918 | 1016 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| α-Pinène | 929 | 1016 | **58,8** | **68,4** | **56,0** | **62,5** | **61,0** | **64,9** | **62,5** | **50,9** | **61,0** | **58,8** | **62,4** | **55,0** |
| Camphène | 941 | 1063 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Sabinène | 962 | 1121 | 0,8 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,8 | 0,8 | 0,8 |
| *β*-Pinène | 968 | 1110 | **1,6** | **1,7** | **1,5** | **1,8** | **1,7** | **1,6** | **1,4** | **1,7** | **1,5** | **1,6** | **1,6** | **1,3** |
| Myrcène | 978 | 1159 | **3,7** | **1,7** | **2,8** | **4,1** | **3,5** | **4,3** | **5,7** | **10,1** | **3,9** | **9,1** | **2,9** | **2,1** |
| δ-3-Carène | 1003 | 1147 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,1 | 0,4 |
| α-Terpinène | 1006 | 1179 | 0,1 | Tr | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| *p*-Cymène | 1009 | 1269 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Limonène | 1019 | 1200 | **17,3** | **7,5** | **15,6** | **16,4** | **17,1** | **17,3** | **18,7** | **21,9** | **17,9** | **16,6** | **20,6** | **21,6** |
| *β*-Phellandrène | 1019 | 1209 | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| γ-Terpinène | 1046 | 1243 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Terpinolène | 1076 | 1281 | **0,8** | **0,4** | **0,6** | **0,5** | **0,6** | **0,6** | **0,6** | **1,0** | **0,6** | **0,8** | **0,6** | **0,5** |
| α-Campholénal | 1102 | 1489 | **0,2** | **2,4** | **1,6** | **0,4** | **1,0** | **0,2** | **0,1** | **0,2** | **0,5** | **0,2** | **0,5** | **1,1** |
| Camphre | 1118 | 1514 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,5 |
| Trans-pinocarvéol | 1120 | 1651 | **0,1** | **1,2** | **0,7** | **0,3** | **0,6** | **0,1** | **0,1** | **0,1** | **0,3** | **0,1** | **0,2** | **0,7** |
| Trans-verbénol | 1125 | 1674 | 0,1 | 0,5 | 0,9 | 0,3 | 0,5 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 1,0 |
| Bornéol | 1146 | 1996 | Tr | Tr | Tr | Tr | Tr | Tr | Tr | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | Tr |
| Terpinéol-4 | 1159 | 1598 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,6 |
| α-Terpinéol | 1169 | 1996 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Perrilaldéhyde | 1242 | 1784 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| Acétate de bornyle | 1266 | 1576 | **1,9** | **2,0** | **1,7** | **1,8** | **1,4** | **0,9** | **0,9** | **1,7** | **0,9** | **1,1** | **0,7** | **1,1** |
| Acétate d'α-terpinyle | 1329 | 1691 | **2,5** | **2,3** | **1,7** | **1,2** | **1,4** | **0,9** | **1,2** | **2,3** | **1,3** | **1,9** | **1,5** | **2,0** |
| α-Copaène | 1372 | 1486 | **0,1** | -------- | **0,5** | **0,2** | **0,2** | **0,2** | **0,3** | **0,7** | **0,3** | **0,1** | **0,2** | **0,1** |
| *β*-Elèmène | 1384 | 1584 | 0,1 | -------- | 0,1 | Tr | Tr | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | -------- |
| Sibérène | 1396 | 1545 | **0,1** | -------- | **0,7** | **0,3** | **0,4** | **0,4** | **0,4** | **1,0** | **0,4** | **0,1** | **0,3** | **0,1** |
| *(E)-β*-Caryophyllène | 1413 | 1591 | **0,7** | **1,1** | **2,9** | **1,2** | **1,4** | **1,2** | **0,1** | **0,3** | **2,3** | **1,5** | **1,2** | **2,6** |
| α-Humulène | 1446 | 1662 | **0,4** | **0,5** | **0,8** | **0,4** | **0,5** | **0,3** | **Tr** | **0,1** | **0,6** | **0,4** | **0,3** | **0,7** |
| γ-Muurolène | 1466 | 1681 | 0,1 | -------- | Tr | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | Tr | -------- |
| Germacrène D | 1472 | 1702 | **2,7** | **0,4** | **1,2** | **0,9** | **1,1** | **1,8** | **2,0** | **1,7** | **1,9** | **1,1** | **0,8** | **0,1** |
| γ-Cadinène | 1502 | 1752 | **1,8** | **0,1** | **0,5** | **0,9** | **0,5** | **1,0** | **1,3** | **0,2** | **0,2** | **0,6** | **0,5** | **0,1** |
| δ-Cadinène | 1510 | 1750 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | Tr |
| α-Cadinène | 1525 | 1780 | 0,1 | -------- | Tr | Tr | Tr | Tr | Tr | -------- | -------- | Tr | -------- | -------- |
| Oxyde de caryophyllène | 1565 | 1974 | **0,2** | **0,6** | **1,1** | **0,3** | **0,4** | **0,1** | **Tr** | **Tr** | **0,3** | **0,2** | **0,3** | **1,6** |
| *Epi*-Cubénol | 1611 | 2056 | **0,1** | -------- | **0,4** | **0,1** | **0,2** | **0,1** | **0,2** | **0,3** | **0,2** | **0,1** | **0,1** | **0,1** |
| τ-cadinol | 1620 | 2162 | 0,3 | -------- | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | Tr | Tr | 0,1 | 0,1 | -------- |
| (*Z*)-Biformène | 1971 | 2312 | 0,2 | 0,2 | Tr | Tr | Tr | 0,1 | Tr | Tr | -------- | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| (*E*)-Biformène | 1997 | 2357 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | Tr | 0,1 | Tr | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| **Total (%)** | | | **97,8** | **94,1** | **95,0** | **97,1** | **97,1** | **99,0** | **98,8** | **98,8** | **98,1** | **98,3** | **98,6** | **95,7** |

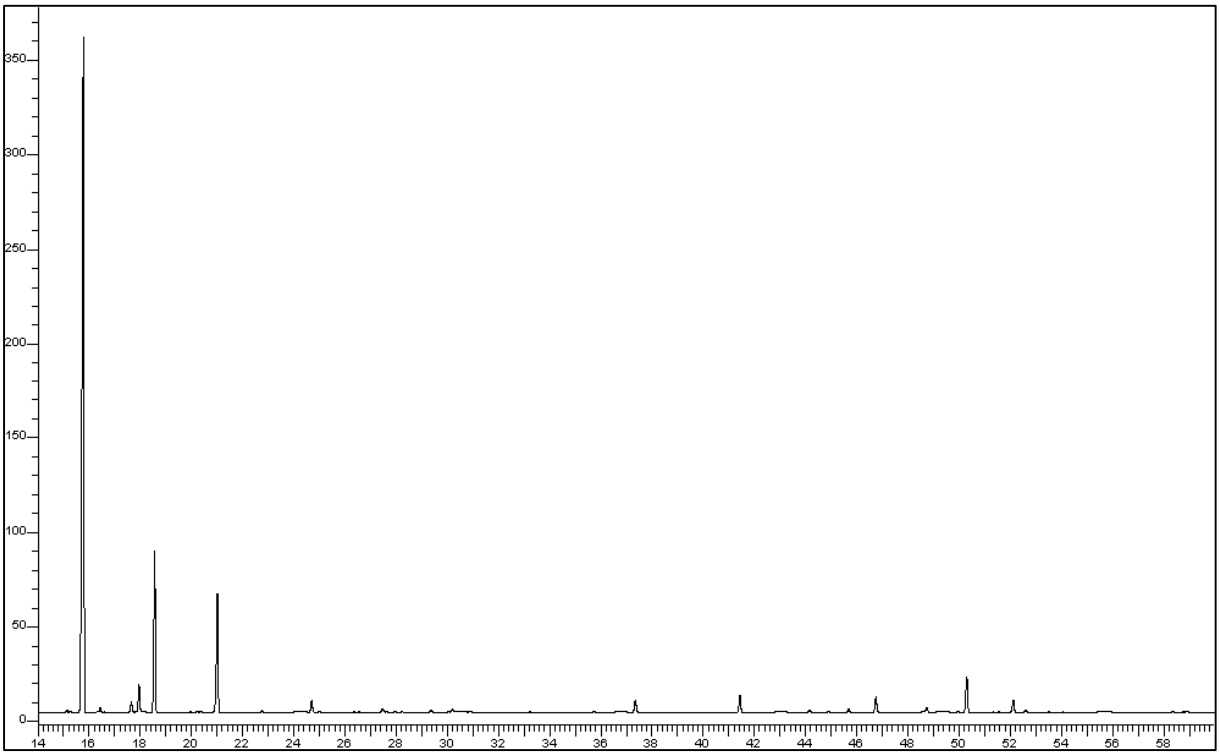
**Annexe 4 : Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de l'échantillon Sab45 de *Tetraclinis articulata* sur une colonne apolaire**



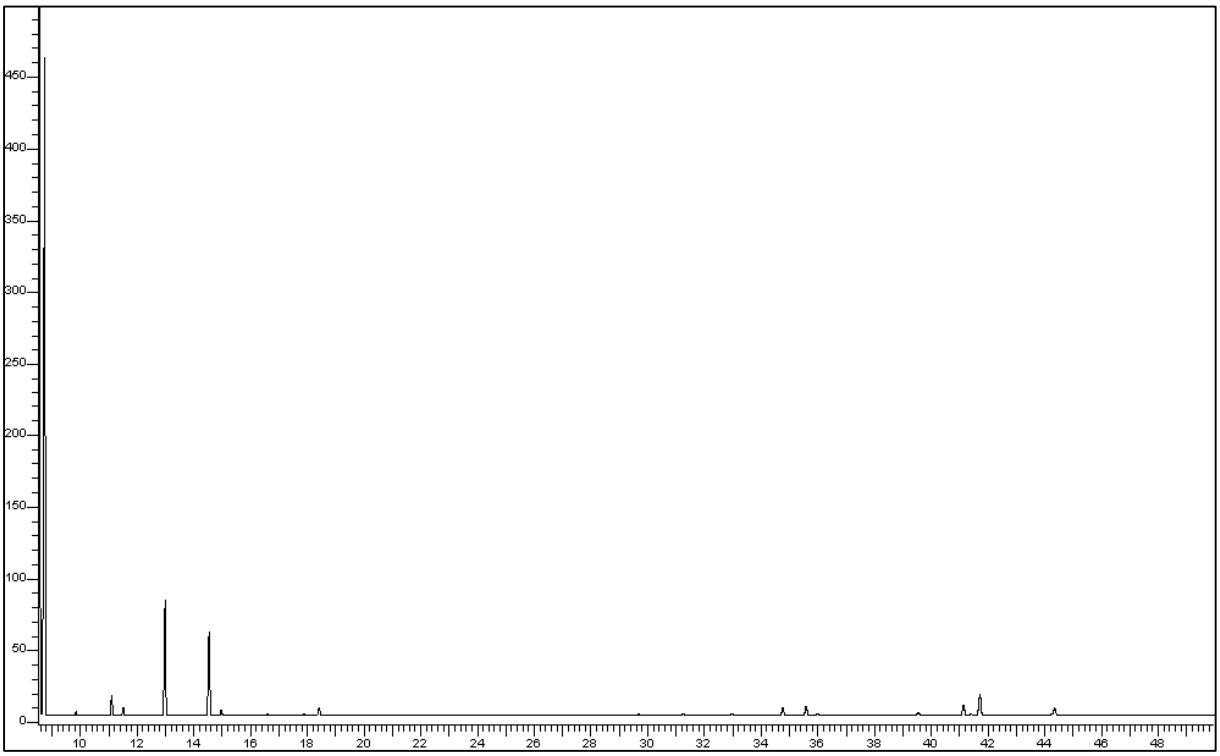

**Annexe 5 : Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de l'échantillon Sab45 de *Tetraclinis articulata*sur une colonne polaire**



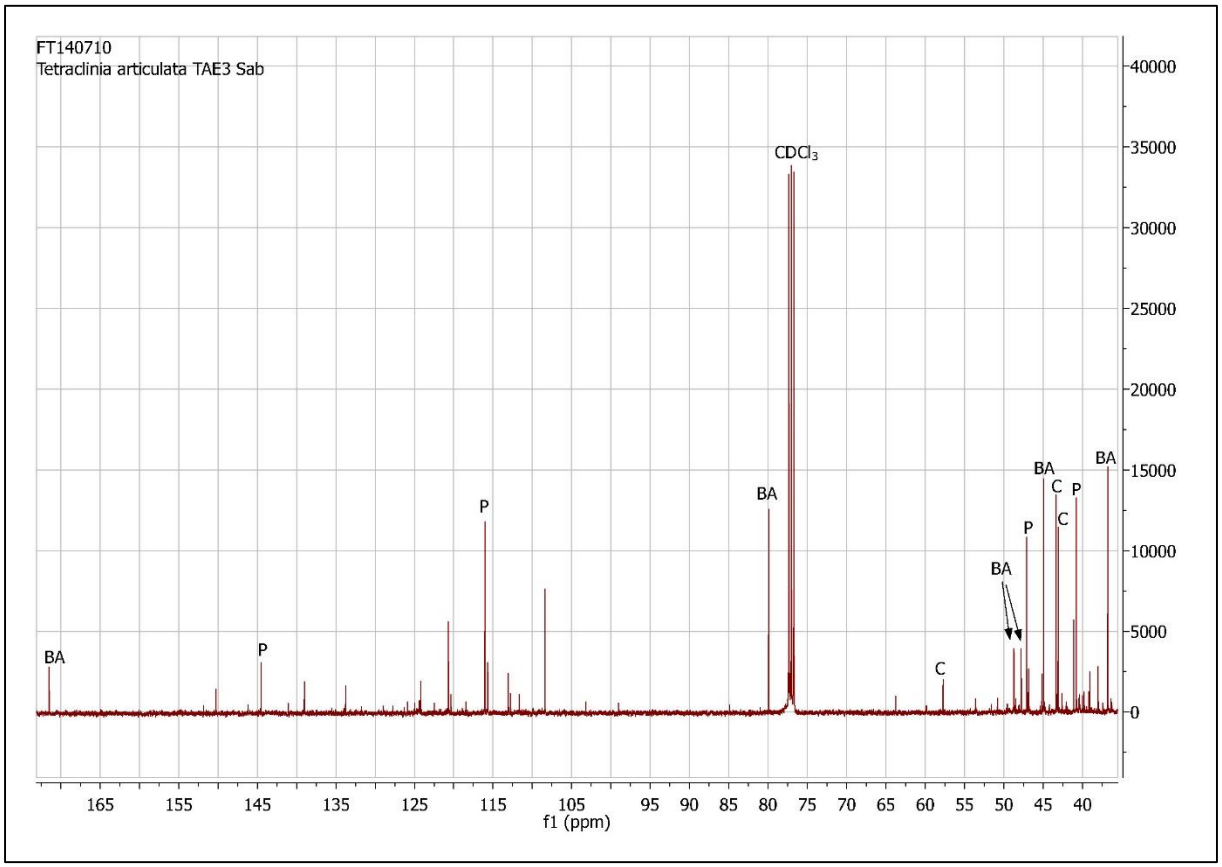
**Annexe 6 : Chromatogramme de l'huile essentielle des cônes de l'échantillon Sab6 de *Tetaclinis articulata* sur une colonne apolaire**




**Annexe 7 : Chromatogramme de l'huile essentielle des cônes de l'échantillon Sab6 de *Tetaclinis articulata* sur une colonne polaire**

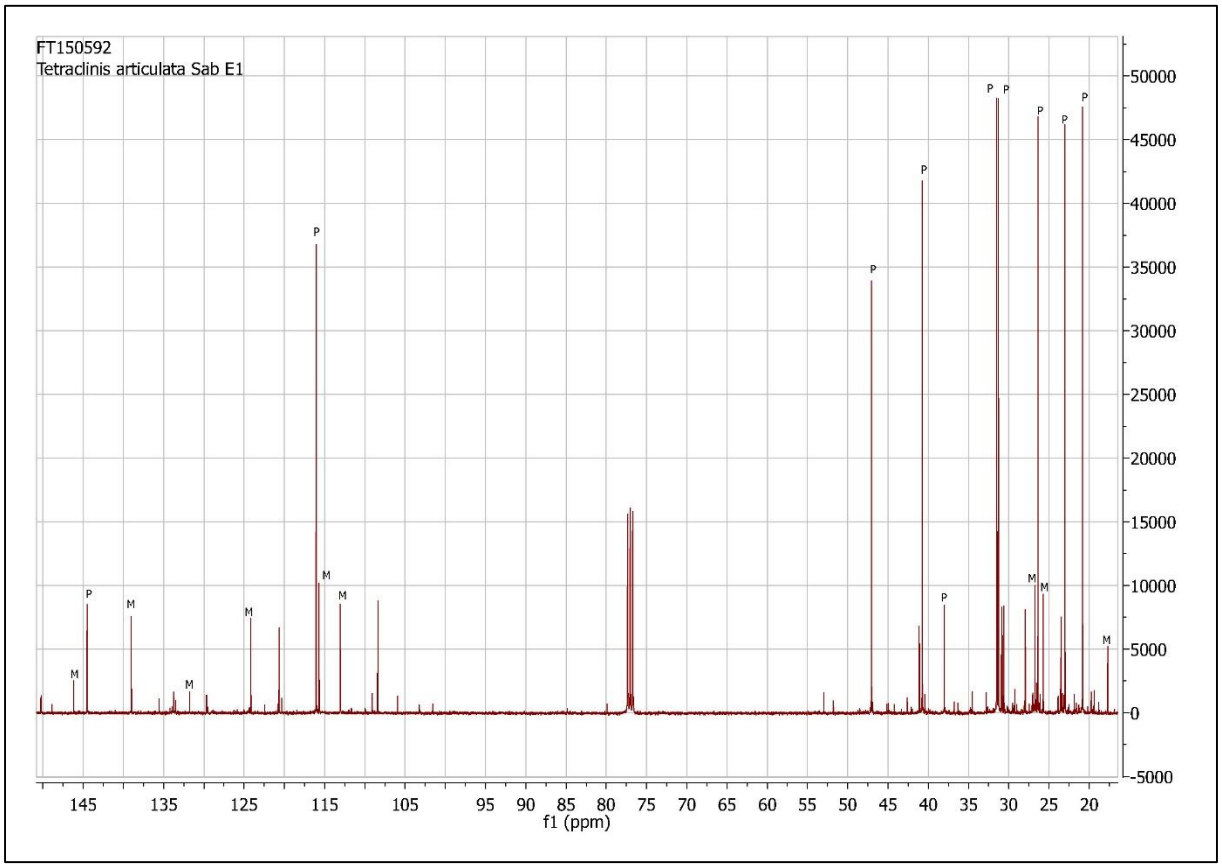


**Annexe 8 : Spectre RMN $^{13}C$ de l'huile essentielle des parties aériennes de l'échantillon Sab45 de *Tetraclinis articulata***



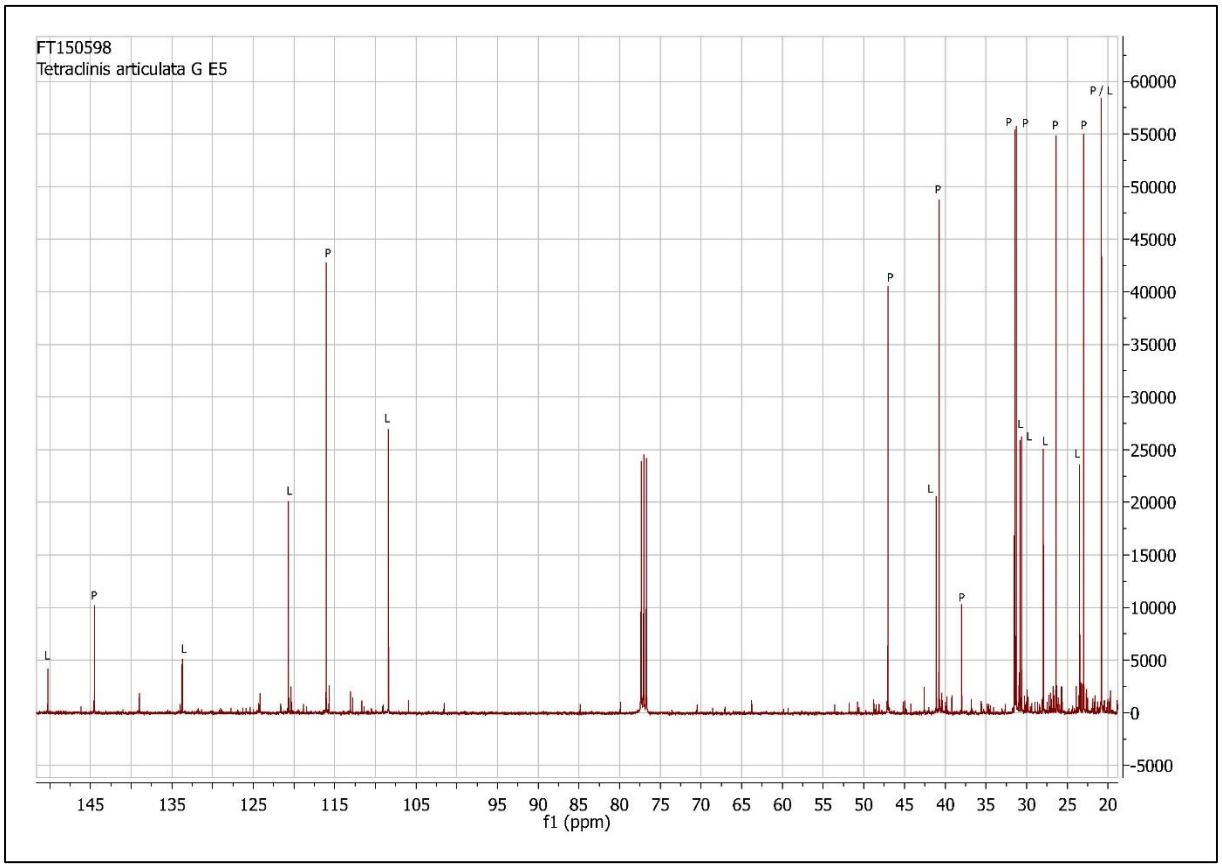

**P : Pinène ; C : Camphre ; AB : Acétate de bornyle**
**Déplacements chimiques des composés majoritaires suivants :**
**α-Pinène (23,6%) :** 144,53 ; 116,04 ; 47,07 ; 40,77 ; 37,99 ; 31,48 ; 31,28 ; 26,38 ; 22,99 ; 20,81
**Camphre (17,3%) :** 57,66 ; 46,81 ; 43,33 ; 43,10 ; 29 ,95 ; 19,80 ; 19,17 ; 9,26
**Acétate de bornyle (20,7%) :** 171,49 ; 79,90 ; 48,71 ; 47,79 ; 44,92 ; 36,78 ; 28,05 ; 27,09 ; 21,31 ; 19,73 ; 18,85 ; 13,49

**Annexe 9 : Spectre RMN $^{13}C$ de l'huile essentielle des parties aériennes de l'échantillon Sab6 de *Tetraclinis articulata***




**P : Pinène ; M : Myrcène**
**Déplacements chimiques des composés majoritaires suivants :**
**α-Pinène (62,4%) :** 144,52 ; 116,04 ; 47,04 ; 40,74 ; 37,98 ; 31,47 ; 31,28 ; 26,36 ; 23,00 ; 20,81
**Myrcène (11,6%) :** 146,16 ; 139,01 ; 131,76 ; 124,13 ; 115,64 ; 113,03 ; 31,43 ; 26,74 ; 25,70 ; 17,70

**Annexe 10 : Spectre RMN $^{13}C$ de l'huile essentielle des parties aériennes de l'échantillon G40 de *Tetraclinis articulata***




**P : Pinène ; L : Limonène**
**Déplacements chimiques des composés majoritaires suivants :**
**α-Pinène (55,0%) :** 144,52 ; 116,04 ; 47,04 ; 40,74 ; 37,98 ; 31,47 ; 31,27 ; 26,36 ; 23,00 ; 20,81
**Limonène (21,6%) :** 150,24 ; 133,73 ; 120,66 ; 108,39 ; 41,10 ; 30,82 ; 30,61 ; 27,93 ; 23,48 ; 20,81

# Publications

# Valorisation des travaux de la thèse

Les travaux exposés dans ce manuscrit ont fait l'objet de deux articles internationaux publiés dans la revue suivante : *Natural Product Communications*, journal indexé et reconnu avec un comité de lecture international. Ces travaux ont également été valorisés scientifiquement par des communications affichées.

## ➢ Publications scientifiques dans une revue à comité de lecture

**M. Boussaïd**, C. Bekhechi, F. Beddou, D. Chabane Sari, A. Bighelli, J. Casanova and F. Tomi **(2015)** Chemical Variability of the Essential Oil Isolated from Aerial Parts of *Tetraclinis articulata* from North-Western Algeria. *Natural Product Communications*, 10 : 1447-1452.

**M. Boussaïd**, C. Bekhechi, F. Atik-Bekkara, M. Paoli, J. Casanova and F. Tomi **(2016)** Composition and Chemical Variability of the Cone Oil from Algerian *Tetraclinis articulata.* Natural Product Communications, 11: 1167-1170.

## ➢ Communications par affiche

**IV$^{ème}$ congrès international de Biotechnologie et valorisation des bio-ressources (AT-BVBR), du 24 au 27 mars 2016, Hammamet, Tunisie**

Boussaïd M., Bekhechi C., Beddou F., Chabane Sari D., Bighelli A., Casanova J., Tomi F.

« Variabilité chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *Tetraclinis articulata* du nord-ouest algérien »

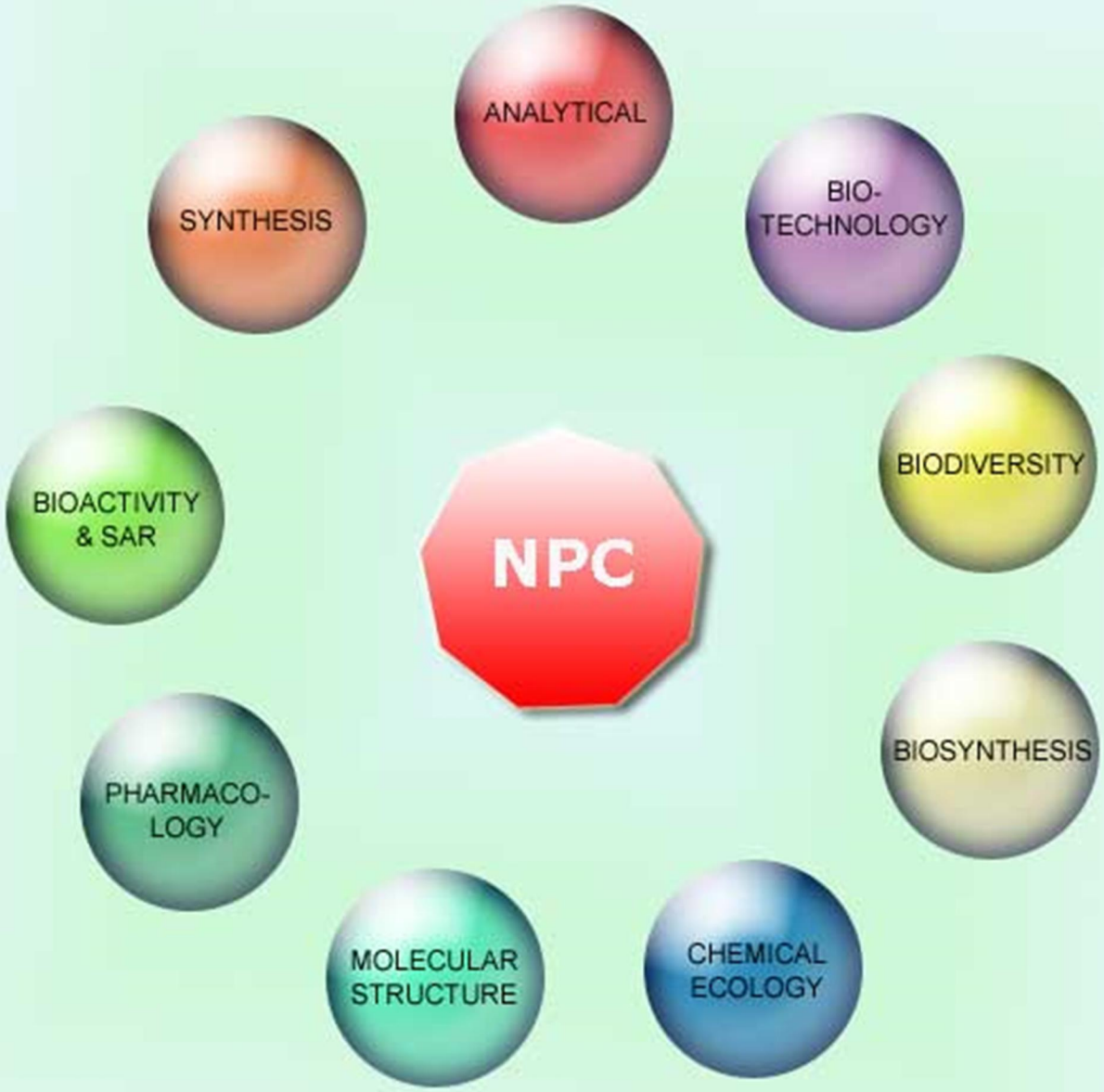
**6$^{th}$ International Congress of Aromatic and Medicinal Plants (CIPAM 2016), du 29 mai au 01 juin, Vila Galé Hotel Coimbra, Portugal**

Boussaïd M., Bekhechi C., Atik-Bekkara F., Beddou F., Chabane Sari D., Bighelli A., Casanova J., Tomi F.

« Composition and chemical variability of the leaf and cone oil from Algerian *Tetraclinis articulata* »

# NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

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




Volume 10. Issue 8. Pages 1333-1494. 2015
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

**NPC** **Natural Product Communications**

**EDITOR-IN-CHIEF**

**DR. PAWAN K AGRAWAL**
*Natural Product Inc.*
*7963, Anderson Park Lane,*
*Westerville, Ohio 43081, USA*
*agrawal@naturalproduct.us*

**HONORARY EDITOR**

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

**EDITORS**

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

**PROFESSOR ALESSANDRA BRACA**
*Dipartimento di Chimica Bioorganicae Biofarmacia,*
*Universita di Pisa,*
*via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy*
*braca@farm.unipi.it*

**PROFESSOR DE-AN GUO**
*State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,*
*School of Pharmaceutical Sciences,*
*Peking University,*
*Beijing 100083, China*
*gda5958@163.com*

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

**PROFESSOR STEPHEN G. PYNE**
*Department of Chemistry*
*University of Wollongong*
*Wollongong, New South Wales, 2522, Australia*
*spyne@uow.edu.au*

**PROFESSOR MANFRED G. REINECKE**
*Department of Chemistry,*
*Texas Christian University,*
*Forts Worth, TX 76129, USA*
*m.reinecke@tcu.edu*

**PROFESSOR WILLIAM N. SETZER**
*Department of Chemistry*
*The University of Alabama in Huntsville*
*Huntsville, AL 35809, USA*
*wsetzer@chemistry.uah.edu*

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

**PROFESSOR DAVID E. THURSTON**
*Department of Pharmacy and Forensic Science,*
*King's College London,*
*Britannia House, 7 Trinity Street,*
*London SE1 1DB, UK.*
*david.thurston@kcl.ac.uk*

**ADVISORY BOARD**

Prof. Viqar Uddin Ahmad
*Karachi, Pakistan*

Prof. Giovanni Appendino
*Novara, Italy*

Prof. Yoshinori Asakawa
*Tokushima, Japan*

Prof. Roberto G. S. Berlinck
*São Carlos, Brazil*

Prof. Anna R. Bilia
*Florence, Italy*

Prof. Maurizio Bruno
*Palermo, Italy*

Prof. César A. N. Catalán
*Tucumán, Argentina*

Prof. Josep Coll
*Barcelona, Spain*

Prof. Geoffrey Cordell
*Chicago, IL, USA*

Prof. Fatih Demirci
*Eskişehir, Turkey*

Prof. Ana Cristina Figueiredo
*Lisbon, Portugal*

Prof. Cristina Gracia-Viguera
*Murcia, Spain*

Dr. Christopher Gray
*Saint John, NB, Canada*

Prof. Dominique Guillaume
*Reims, France*

Prof. Duvvuru Gunasekar
*Tirupati, India*

Prof. Hisahiro Hagiwara
*Niigata, Japan*

Prof. Tsukasa Iwashina
*Tsukuba, Japan*

Prof. Leopold Jirovetz
*Vienna, Austria*

Prof. Vladimir I Kalinin
*Vladivostok, Russia*

Prof. Phan Van Kiem
*Hanoi, Vietnam*

Prof. Niel A. Koorbanally
*Durban, South Africa*

Prof. Chiaki Kuroda
*Tokyo, Japan*

Prof. Hartmut Laatsch
*Gottingen, Germany*

Prof. Marie Lacaille-Dubois
*Dijon, France*

Prof. Shoei-Sheng Lee
*Taipei, Taiwan*

Prof. Imre Mathe
*Szeged, Hungary*

Prof. M. Soledade C. Pedras
*Saskatoon, Canada*

Prof. Luc Pieters
*Antwerp, Belgium*

Prof. Peter Proksch
*Düsseldorf, Germany*

Prof. Phila Raharivelomanana
*Tahiti, French Polynesia*

Prof. Luca Rastrelli
*Fisciano, Italy*

Prof. Stefano Serra
*Milano, Italy*

Prof. Monique Simmonds
*Richmond, UK*

Dr. Bikram Singh
*Palampur, India*

Prof. John L. Sorensen
*Manitoba, Canada*

Prof. Johannes van Staden
*Scottsville, South Africa*

Prof. Valentin Stonik
*Vladivostok, Russia*

Prof. Winston F. Tinto
*Barbados, West Indies*

Prof. Sylvia Urban
*Melbourne, Australia*

Prof. Karen Valant-Vetschera
*Vienna, Austria*

## INFORMATION FOR AUTHORS

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

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

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

**To Subscribe**: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2015 subscription price: US$2,595 (Print, ISSN# 1934-578X); US$2,595 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US$2,995 (Print + single site online); US$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

NPC Natural Product Communications

2015
Vol. 10
No. 8
1447 - 1452

# Chemical Variability of the Essential Oil Isolated from Aerial Parts of *Tetraclinis articulata* from North-Western Algeria

**Maghnia Boussaïd[a], Chahrazed Bekhechi[a], Fawzia Beddou[a], Daoudi Chabane Sari[a], Ange Bighelli[b], Joseph Casanova[b] and Félix Tomi[b]***

[a]*Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algeria*
[b]*Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France*

*felix.tomi@univ-corse.fr*

**Received: February 17th, 2015; Accepted: April 28th, 2015**

The objective was to investigate the yield and chemical composition of 50 essential oil samples isolated from leaves and flowers of *Tetraclinis articulata* harvested in eight locations (coastal township and highlands) of Tlemcen Province (North-Western Algeria). Essential oil yields varied drastically from sample to sample (0.03 to 0.86%, w/w). No direct correlation was observed between the yield and the altitude of the harvest areas. The oils consisted mainly of monoterpenes: α-pinene (9.2-56.5%), bornyl acetate (1.2-45.1%), camphor (0.5-40.3%), borneol (0.2-12.9%), limonene (3.6-12.5%), and myrcene (1.6-9.7%). Sesquiterpenes were represented by germacrene D (up to 14.2%) and *(E)*-β-caryophyllene (up to 13.3%). PCA analysis of the data allowed the distinction of two groups within the samples. The composition of group I (9 samples) was dominated by camphor, (Mean = 30.9%) followed by α-pinene (M = 19.1%) and bornyl acetate (M = 11.4%). Group II was divided into two sub-groups. Samples of sub-group IIA (8 samples) contained mainly α-pinene (M = 45.4%). Samples of the largest group IIB (33 samples) were characterized by similar contents of α-pinene (M = 28.2%) and bornyl acetate (M = 24.5%) and the occurrence of camphor to a lesser extent (M = 10.0%).

**Keywords:** *Tetraclinis articulata*, Cupressaceae, Essential oil composition, Yield variability, Chemical variability, $^{13}$C NMR, Statistical analysis.

*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae family), also known as *Callitris quadrivalvis* Vent. or *C. articulata* (Vahl) Link, is widespread in North Africa, although it is also found on the coast of southeastern Spain (region of Cartagena, where only a tiny relict population remains) and in Malta (where it is endangered) [1,2]. In Morocco, it is present from the north of Rif to Anti-Atlas and in the region of Ifni. In Tunisia, it is found between Bizerte and Zaghouan. In Algeria, it is present in some isolated stations to the west of Algiers, but overall it is widespread in the northwestern part of the country and particularly in Tlemcen Province [2]. Therefore, the valorization of this plant may be undertaken under various aspects, including the industrial production of essential oil.

*T. articulata* is a shrub or a small tree. The branches are flattened, green and articulated. The leaves are arranged in opposite decussate pairs, forming apparent whorls of four. The cones are glaucous, pruinose and tetragonal [1]. *T. articulata*, commonly known as "Ahrar" [1], has been used in folk medicine against respiratory and intestinal infections, gastric pains, hypertension and diarrhea, and to treat fever (leaves, aerial parts). It has been used as a diuretic, antipyretic, anti-rheumatic and oral hypoglycemic [3-5]. In parallel, various biological activities have been reported for extracts and essential oils (seeds, leaves, aerial parts) such as cytotoxic [6-8], vasorelaxant [9], antimicrobial [10-20], antioxidant and anti-inflammatory activities [21,22].

The essential oil of *T. articulata* is obtained by hydrodistillation of different parts of the plant (leaves, twigs, branches, cones, roots, wood and sawdust) and its composition has been widely investigated. Results are summarized in Table 1:

- Concerning the composition of Moroccan wood sawdust, two types of essential oils could be distinguished: those whose composition is dominated by oxygenated sesquiterpenes [23,24] and those whose composition exhibited a phenol derivative among the main components [17,18,25,34].
- A cone oil sample and a seed oil sample from Malta contained mainly α-pinene and limonene [26], while Tunisian cone oil contained various components at appreciable contents [27]. The composition of a root oil sample from Tunisia was largely dominated by camphene [27].
- The composition of twig and branch oils of *T. articulata* differed from country to country. Moroccan oils contained mainly α-pinene and limonene [10,28]. Woody and non-woody oils of Maltese origin, isolated from terminal branches, differed slightly in their contents of α-pinene, bornyl acetate and camphor [26]. In contrast, Tunisian woody and non-woody oil samples from terminal branches exhibited substantially different compositions [27].
- Various works reported on the composition of *T. articulata* leaf oils. All the investigated oil samples were characterized by the occurrence of monoterpenes as major components. However, several compositions were observed with respect to the contents of the three principal components, mainly α-pinene, camphor and bornyl acetate [11,24,28,30,31]. A needle oil sample from Canada contained also 3-carene and β-myrcene among major constituents [29]. A Tunisian oil sample (as well as the SFE extract) displayed a high content of linalyl acetate beside α-pinene [32].

Concerning *T. articulata* growing wild in Algeria, the composition of few essential oil samples have been reported. Two cone oil samples were characterized by a high content of α-pinene, followed by limonene [19], as already found in Malta [26]. Algerian *T. articulata* leaf oil contained high to fair amounts of bornyl acetate, α-pinene and camphor [19,22] and more scarcely borneol [33].

Finally, *T. articulata* leaf oils isolated from leaves collected in the Province of Tlemcen (Western Algeria) exhibited a similar behavior.

**Table 1:** Chemical compositions of *Tetraclinis articulata* essential oils (literature).

| Part of the plant | Country | EM | Main components | Yield % | ref |
|---|---|---|---|---|---|
| sawdust | Morocco Khemisset | HD | Acorenol (20.9%), cedrol (17.9%), totarol (8.8%), α-cedrene (8.7%) | 1.63 | [23] |
| sawdust | Morocco (Aoulouz/Khemisset) | HD | Carvacrol (21.3-36.4%), α-cedrene (10.1-13.1%) | 3.75/1.9 | [25] |
| sawdust | Morocco (Essaouira) | HD | Carvacrol (30.5%), O-methylthymohydroquinone (16.5%), cedrol (12.1%) | 2.5 | [34] |
| wood | Morocco (Oued Cherrat) | HD | Carvacrol (28.0%), p-methoxythymol (22.1%), thymohydroquinone (16.1%), cedrol (7.2%) | 2.0 | [4] |
| wood | Morocco | HD | 2,5-Dimethoxyacetophenone (22.5%), β-acorenol (20.4%), cedrol (12.2%) | 1.25 | [17] |
| wood | Morocco (Oulmes) | HD | Cedrene (22.7%), thymol (21.6%), 3-*t*butyl-4-Methoxyphenol (19.0%) | 2.0 | [18] |
| wood | Morocco (Tetouan) | HD | Cedrol (28.2%), 1,7-di-epi-cedrol (17.9%) | 1.3 | [24] |
| root | Tunisia | HD | Camphene (70.2%) | 0.09 | [27] |
| cone | Malta (Msida) | | α-Pinene (68.2%), limonene (16.6%) | 0.31 | [26] |
| cone | Tunisia | HD | *p*-Cymen-8-ol (10.4%), β-phellandrene (8.1%) | 0.05 | [27] |
| cone | Algeria (Blida/Tipaza) | HD | α-Pinene (57.5%/75.0%), limonene (20.9%/10.6%) | 0.8/1.6 | [19] |
| seed | Malta (Msida) | | α-Pinene (46.3%), limonene (25.3%) | 0.55 | [26] |
| twig | Morocco (Oued Cherrat) | HD | Bornyl acetate (30.5%), camphor (18.6%), borneol (10.2%) | 0.25 | [4] |
| twig | Morocco (Essaouira) | HD | α-Pinene (37.2%), limonene (23.3%) | 0.32 | [28] |
| branch | Morocco (Khemisset) | HD | α-Pinene (30.2%), limonene (22.3%), widdrol (5.4%), bornyl acetate (4.8%) | 0.41 | [10] |
| branch (woody) | Malta (Msida) | | α-Pinene (31.0%), bornyl acetate (19.1%), camphor (18.1%) | 1.53 | [26] |
| branch (non woody) | Malta (Msida) | | α-Pinene (46.4%), bornyl acetate (19.9%), camphor (7.3%) | 1.20 | [26] |
| branch (woody) | Tunisia | HD | Camphene (43.2%), (*Z*)-β-ocimene (11.7%) | 0.13 | [27] |
| branch (non woody) | Tunisia | HD | Muurolene (29.0%), 4,6-dimethyloctane -3,5-dione (22.4%) | 0.22 | [27]. |
| leaves | Canada (Toronto) | HS-SPME | α-Pinene (32.7%), 3-carene (18.3%) β-myrcene (11.7%), bornyl acetate (5.9%) | - | [29] |
| leaves | Morocco (Khemisset) | HD | Bornyl acetate (30.7%), α-pinene (23.5%), camphor (17.3%) | 0.22 | [11] |
| leaves | Morocco (Khemisset) | HD | Bornyl acetate (30.6%), camphor (18.6%), α-pinene (16.8%) | 0.22 | [23] |
| leaves | Morocco (Essaouira) | HD | Camphor (31.6%), bornyl acetate (25.4%) | 0.22 | [28] |
| Leaves (fresh/dried) | Morocco (Marrakech) | SD | α-Pinene (41.0%/23.0%), bornyl acetate (20.6%/36.4%) | 0.06/0.28 | [30] |
| leaves | Morocco (Tetouan) | HD | Camphor (19.1%), bornyl acetate (16.5%), borneol (9.6%) | 0.70 | [24] |
| leaves | Tunisia (Bou Kornine) | HD | Bornyl acetate (31.4%), α-pinene (24.5%), camphor (20.3%) | 0.11 | [31] |
| leaves | Tunisia (Cap Bon) | HD | α-Pinene (24.9%), linalyl acetate (21.4%) | 0.06 | [32] |
| leaves | Tunisia (Cap Bon) | SFE (90/ 280/1000 bars) | α-Pinene (31.3/0/0%), linalyl acetate (18.2/1.7/0%), alloaromadendrene (7.6/1.4/0%), palmitic acid (0/3.0/36.2%) | 0.16/0.19/ 0.25 | [32] |
| leaves | Algeria (Tipaza) | HD | Bornyl acetate (59.2%), α-pinene (19.8%) | 0.65 | [19] |
| leaves | Algeria (Blida) | HD | Bornyl acetate (40.2%), α-pinene (24.9%) | 0.4 | [19] |
| leaves | Algeria (Aïn Defla) | HD | Bornyl acetate (24.4%), α-pinene (23.6%), camphor (18.3%) | 0.56 | [22] |
| leaves | Algeria (Aïn Defla) | MAHD | Bornyl acetate (32.4%), α-pinene (12.5%), camphor (21.4%) | 0.54 | [22] |
| leaves | Algeria (El Haçaiba, Sidi Bel Abbes) | HD | Camphor (26.7%), bornyl acetate (25.8%), borneol (12.9%) | 0.75 | [33] |
| leaves | Algeria (Frenda, Tiaret), | HD | Camphor (23.4%), bornyl acetate (24.6%), borneol (6.6%), α-pinene (11.3%) | 0.35 | [33] |
| leaves | Algeria (Ghazaouet, Tlemcen) | HD | Bornyl acetate (52.1%), camphor (2.1%) | 0.33 | [15] |
| leaves | Algeria (Ouled Mimoun, Tlemcen), | HD | Camphor (31.6%), bornyl acetate (17.1%), borneol (14.3%), | 0.78 | [33] |
| Aerial parts | Algeria (Oujlida, Tlemcen) | HD | α-Pinene (32.0%), cedrol (11.0%), δ-3-carene (9.6%) | 0.31 | [20] |

EM = Extraction method; HD = Hydrodistillation; SD = Steam distillation; SFE = Supercritical Fluid Extraction; HS-SPME = Head Space-Solid Phase Micro Extraction; MAHD = microwave-assisted hydrodistillation;

Leaves of *T. articulata* collected at Ghazaouet yielded an essential oil characterized by a high content of bornyl acetate, a very low amount of camphor, and the absence of α-pinene [15]. Camphor and bornyl acetate were the major components of an essential oil sample from Ouled Mimoun, accompanied by borneol [33]. Finally, a quite different composition was observed for another essential oil sample isolated from aerial parts in Oujlida, dominated by α-pinene beside cedrol and δ-3-carene, while the content of bornyl acetate was significantly lower and camphor was totally absent [20].

From this overview of the literature two points should be highlighted: i) the composition of *T. articulata* essential oil has been widely investigated and various compositions have been reported for essential oils isolated from different parts of the plant; moreover, the contents of major components varied drastically from sample to sample; ii) In contrast, all the investigations concerned the analysis of only one or two oil samples (for every part of the plant) and therefore, the composition is not representative of *T. articulata* essential oil of a given country. This is particularly important for leaf oil, which is the more appropriate for industrial purposes, as leaves are a sustainable resource. So, the purpose of the present study was to characterize the essential oil isolated from aerial parts (leaves and flowers) of *T. articulata* growing wild in the Province of Tlemcen (Algeria) where this plant is widespread. For that purpose, fifty oil samples have been isolated from plants harvested in eight locations and analyzed. The 50 compositions have been submitted to statistical analysis in order to determine if *T. articulata* produces homogeneous oil or if there is evidence of chemical variability. We will first report on the detailed analysis of one essential oil sample that has been carried out by a combination of chromatographic and spectroscopic techniques and then on the statistical analysis.

***Chemical composition of a selected oil sample:*** Sample 45 was submitted to GC on two columns of different polarity ([GC(RI)]. The compounds were characterized from their retention indices and $^{13}$C NMR spectra, following a method developed in our laboratory [35-36]. In total, 35 compounds were identified, accounting for 97.5% of the whole composition (Table 2). Identification of 17 out of 35 components was ensured by $^{13}$C NMR in that sample. Moreover, six other samples have been analyzed by GC(RI) and $^{13}$C NMR and the identification of five other constituents has been confirmed by NMR. The composition of sample 45 was dominated by α-pinene (23.6%) bornyl acetate (20.7%) and camphor (17.3%). Limonene (9.5%), myrcene (3.8%) and camphene (1.1%) were the other monoterpene hydrocarbons present in appreciable contents. Major oxygenated monoterpenes were represented by borneol (2.7%), α-terpinyl acetate (1.5%) and camphene hydrate (0.9%). The most important sesquiterpene hydrocarbons were: (*E*)-β-caryophyllene (4.7%), α-humulene (1.3%) and germacrene D (1.1%). Finally, caryophyllene oxide (2.3%) was the major oxygenated sesquiterpene.

**Table 2:** Chemical composition of an essential oil sample from leaves and flowers of *Tetraclinis articulata*.

| Compounds [a]) | $RI_a$[b]) | $RI_p$[c]) | (%) | Identification mode |
|---|---|---|---|---|
| Tricyclene | 922 | 1015 | 0.7 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Pinene | 932 | 1015 | 23.6 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Camphene | 945 | 1065 | 1.1 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Sabinene | 966 | 1123 | 0.4 | RI, MS |
| β-Pinene | 972 | 1112 | 0.7 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Myrcene | 982 | 1161 | 3.8 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| δ-3-Carene | 1006 | 1149 | Tr | RI, MS |
| α-Terpinene | 1010 | 1181 | 0.2 | RI, MS |
| *p*-Cymene | 1013 | 1271 | 0.2 | RI, MS, *$^{13}$C NMR* |
| Limonene | 1023 | 1202 | 9.5 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| (*E*)-β-Ocimene | 1037 | 1250 | Tr | RI, MS |
| γ-Terpinene | 1049 | 1245 | 0.4 | RI, MS |
| *p*-Cymenene | 1074 | 1436 | 0.1 | RI, MS |
| Terpinolene | 1080 | 1283 | 0.4 | RI, MS |
| α-Campholenal | 1105 | 1488 | 0.3 | RI, MS |
| Camphor | 1123 | 1514 | 17.3 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| trans-Verbenol | 1124 | 1680 | 0.1 | RI, MS |
| Camphene hydrate | 1133 | 1591 | 0.9 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Borneol | 1150 | 1694 | 2.7 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Terpineol-4 | 1162 | 1597 | 0.8 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Terpineol | 1173 | 1691 | 0.3 | RI, MS |
| Bornyl acetate | 1271 | 1579 | 20.7 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Terpinyl acetate | 1333 | 1691 | 1.5 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Copaene | 1377 | 1491 | 0.3 | RI, MS, *$^{13}$C NMR* |
| (*E*)-β-Caryophyllene | 1419 | 1595 | 4.7 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Humulene | 1451 | 1665 | 1.3 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| γ-Muurolene | 1471 | 1684 | 0.1 | RI, MS, *$^{13}$C NMR* |
| Germacrene D | 1477 | 1704 | 1.1 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Muurolene | 1494 | 1723 | Tr | RI, MS |
| γ-Cadinene | 1507 | 1753 | 0.8 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| δ-Cadinene | 1515 | 1755 | 0.2 | RI, MS, *$^{13}$C NMR* |
| Caryophyllene oxide | 1571 | 1976 | 2.3 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Humulene oxide | 1595 | 2032 | 0.5 | RI, MS, |
| *epi*-Cubenol | 1616 | 2057 | 0.4 | RI, MS, *$^{13}$C NMR* |
| τ-Cadinol | 1626 | 2162 | 0.1 | RI, MS |
| Monoterpene hydrocarbons | | | 41.1 | |
| Oxygenated monoterpenes | | | 44.6 | |
| Sesquiterpene hydrocarbons | | | 8.5 | |
| Oxygenated sesquiterpenes | | | 3.3 | |
| Total (%) | | | 97.5 | |

[a]) Order of elution and percentages are given on apolar column (*BP-1*). [b]) $RI_a$: Retention indices measured on apolar column. [C]) $RI_p$: Retention indices measured on polar column. Tr: Trace. *$^{13}$C NMR* (italic): components identified by NMR in one or more of the six other oil samples analyzed by NMR.

***Chemical variability.*** Fifty samples of essential oil were obtained by water-distillation of leaves and flowers from individual plants of *T. articulata* collected in eight locations in Tlemcen Province, from 42 m to more than 1210 m in altitude (Figure 1).

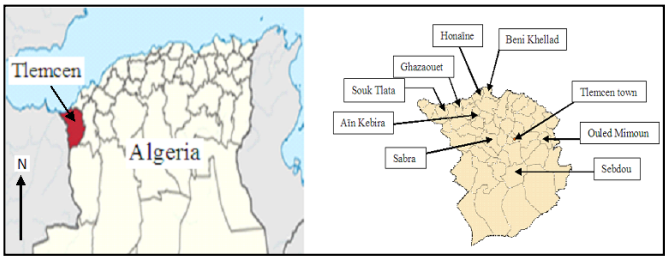



**Figure 1:** Sampling locations of *Tetraclinis articulata* from Tlemcen Province. Coastal township : Honaïne, Beni Khellad, Souk Tlata, Ghazaouet; Highlands : Aïn Kebira, Sebdou, Ouled Mimoun, Sabra

**Table 3:** Yields (%) of the essential oils isolated from leaves and flowers of *Tetraclinis articulata* harvested in Tlemcen Province.

| | | Essential oil yield | | |
|---|---|---|---|---|
| Location of harvest | Altitude | Mean±SD (%) | Min (%) | Max (%) |
| Ghazaouet | 42 | 0.30±0.25 | 0.04 | 0.75 |
| Honaïne | 165 | 0.42±0.11 | 0.26 | 0.52 |
| Beni Khellad | 408 | 0.51±0.22 | 0.20 | 0.86 |
| Sabra | 495 | 0.13±0.10 | 0.03 | 0.30 |
| Souk Tlata | 497 | 0.31±0.22 | 0.10 | 0.64 |
| Ouled Mimoun | 768 | 0.17±0.11 | 0.10 | 0.35 |
| Aïn Kebira | 779 | 0.31±0.10 | 0.15 | 0.45 |
| Sebdou | 1210 | 0.20±0.11 | 0.10 | 0.34 |

SD : standard deviation, Min : minimum, Max : maximum

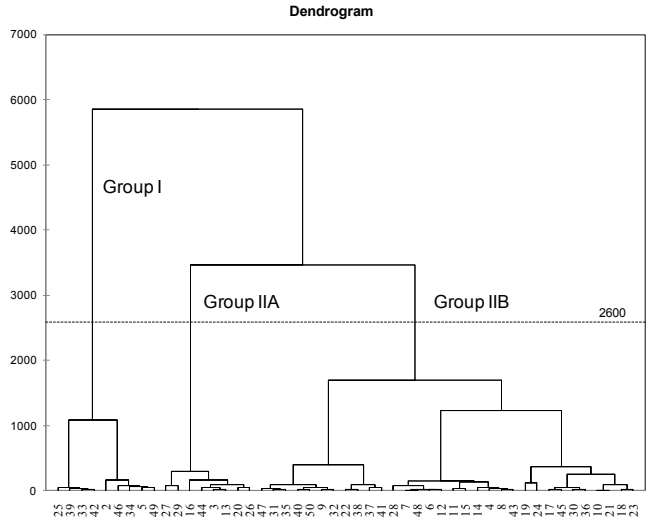



**Figure 2:** Dendrogram obtained from the cluster analysis of 50 samples of *Tetraclinis articulata* leaf oil from Tlemcen Province (Algeria).

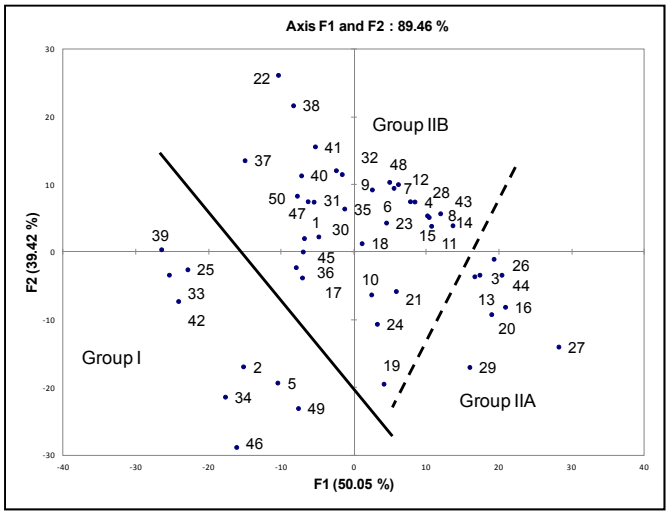



**Figure 3:** PCA scatterplot of 50 essential oil samples of *Tetraclinis articulata* from Tlemcen Province (Algeria).

The essential oil yields (w/w) calculated from dry material, varied drastically from sample to sample, ranging between 0.03 to 0.86%, even within a location (0.04%-0.75% in Ghazaouet, for instance) (Table 3). According to these results, there is no direct relation between the yield of essential oil and altitude. Indeed, similar yield mean values (around 0.30%) have been calculated for Ghazaouet (42 m), Souk Tlata (497 m) and Aïn Kebira (779 m). The highest mean yields were obtained for Honaïne (165 m, 0.42%) and Beni Khellad (408 m, 0.51%). In contrast, two stations located at the same altitude (Sabra, 495 m and Souk Tlata, 497 m) exhibited very different yield mean values (0.13% and 0.31%). With the objective of industrial production, it could be suggested that plants harvested from 40 to 400 m produced more oil (yield = 0.30-0.51%) than those collected in the highlands (500-1200 m, yield = 0.13-0.31%).

All 50 samples were submitted to GC(FID) analysis and retention indices (RIs) of individual components were measured on two columns of different polarity. Among them, 7 samples, selected on the basis of their chromatographic profile, were also analyzed by $^{13}$C NMR. In total, 35 components and accounting for 94.8 –99.1% of the whole oil composition, were identified in the 50 oil samples and they were taken into account in the statistical analysis.

**Table 4:** Chemical variability of *Tetraclinis articulata* essential oil isolated from leaves and flowers: Main components of 50 samples.

| Constituents | Group I (9 samples) | | | | Group II (41 samples) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Sub-group IIA (8 samples) | | | | Sub-group IIB (33 samples) | | | |
| | Mean | S D | Min | Max | Mean | S D | Min | Max | Mean | S D | Min | Max |
| α-Pinene | **19.1** | 7.6 | 9.2 | 29.3 | **45.4** | 5.6 | 40.0 | 56.5 | **28.2** | 6.4 | 16.0 | 41.6 |
| Myrcene | 3.4 | 1.5 | 1.8 | 6.0 | 3.9 | 2.4 | 2.2 | 9.7 | 4.3 | 2.0 | 1.6 | 8.7 |
| Limonene | 7.3 | 2.6 | 3.6 | 11.7 | 6.8 | 2.7 | 4.2 | 12.1 | 7.6 | 2.1 | 4.5 | 12.5 |
| Camphor | **30.9** | 4.2 | 26.0 | 40.3 | 4.0 | 3.8 | 0.5 | 12.7 | **10.0** | 6.0 | 1.6 | 22.6 |
| Borneol | 6.2 | 4.1 | 0.9 | 12.9 | 1.1 | 1.2 | 0.2 | 3.9 | 2.5 | 2.0 | 0.5 | 7.0 |
| Bornyl acetate | **11.4** | 9.6 | 1.2 | 23.6 | **10.5** | 4.6 | 5.3 | 18.5 | **24.5** | 7.7 | 6.5 | 45.1 |
| (E)-β-Caryophyllene | 1.2 | 0.6 | 0.6 | 2.4 | 6.3 | 2.3 | 2.5 | 9.6 | 3.8 | 2.9 | 0.0 | 13.3 |
| Germacrene D | 0.4 | 0.4 | 0.0 | 1.3 | 5.1 | 4.7 | 0.2 | 14.2 | 2.4 | 2.7 | 0.1 | 12.2 |

Main components of 50 samples: mean value (Mean), standard deviation (SD), minimum content (Min) and maximum content (Max)

Monoterpenes were the main constituents of all samples (57.1-95.4%). However, the concentration of the three major components varied drastically from sample to sample; α-pinene (9.2-56.5%), camphor (0.5-40.3%) and bornyl acetate (1.2-45.1%) (Table 4). Other monoterpenes present in appreciable contents were myrcene (up to 9.7%), limonene (up to 12.5%) and borneol (up to 12.9%).The main sesquiterpenes detected were *(E)*-β-caryophyllene (up to 13.3%) and germacrene D (up to 14.2%). The eight major components are reported in Table 4. A combination of hierarchical clustering dendrogram (Fig. 2) and principal components analysis (PCA) (Figure 3), in which the plan defined by the two first axes described 89.5% of the total variance of the population, suggested the existence of two principal groups, which were distinguished on the basis of α-pinene, camphor and bornyl acetate contents. In parallel, group II was divided into two subgroups IIA and IIB.

The samples of group I (9 of 50 samples) were characterized by a high content of camphor [Mean (SD): 30.9% (4.2); Min-Max: 26.0-40.3%)], followed by α-pinene [19.1% (7.6); 9.2-29.3%] and bornyl acetate [11.4% (9.6); 1.2-23.6%]. Limonene [7.3% (2.6); 3.6-11.7%] and borneol [6.2% (4.1); 0.9-12.9%] were the other components present in appreciable contents. In this group, several sesquiterpene hydrocarbons, such as *(E)*-β-caryophyllene [1.2% (0.6); 0.6-2.4%] and germacrene D [0.4% (0.4); 0.0-1.3%] were present in low amounts. With respect to the contents of α-pinene, camphor and bornyl acetate, group II could be divided into two subgroups. Subgroup IIA (8 of 50 samples) was characterized by a very high content of α-pinene [45.4% (5.6); 40.0-56.5%], followed by bornyl acetate [10.5% (4.6); 5.3-18.5%]. We note also the occurrence of germacrene D [5.1% (4.7); 0.2-14.2%]. This subgroup exhibited comparable proportions of limonene [6.8% (2.7); 4.2-12.1%], camphor [4.0% (3.8); 0.5-12.7%], myrcene [3.9% (2.4); 2.2-9.7%] and *(E)*-β-caryophyllene [6.3% (2.3); 2.5-9.6%], all present in appreciable amounts. In contrast, low proportions of borneol were detected [1.1% (1.2); 0.2-3.9%]. Subgroup IIB, the most important (33 of 50 samples), was characterized by high contents of α-pinene [28.2% (6.4); 16.0-41.6%] and bornyl acetate [24.5% (7.7); 6.5-45.1%], accompanied to a lesser extent by camphor [10.0% (6.0); 1.6-22.6%] and limonene [7.6% (2.1); 4.5-12.5%]. The other important components were myrcene, borneol, *(E)*-β-caryophyllene and germacrene D.

Taking into account the compositions of the investigated 50 oil samples, and the results of the statistical analysis, it could be emphasized that wild *T. articulata* from Tlemcen Province is suited for the industrial production of essential oil. For instance, essential oil samples with chemical composition similar to that of the main group have been reported to display antibacterial [11], antioxidant and anti-inflammatory activities [21,22]. In parallel, the occurrence of bornyl acetate in appreciable content confers a pleasant odor. However, with respect to the large diversity observed in the yield of essential oil, even within a location of harvest, it would be necessary to select the plants providing the best yields.

From our study, it could be concluded that the essential oil isolated from aerial parts (leaves and flowers) of *T. articulata* growing wild in the Province of Tlemcen (Algeria) exhibited a composition dominated, for two-thirds of the samples, by α-pinene and bornyl acetate in comparable amounts. Camphor and limonene were also present in appreciable amounts. The compositions of the remaining oil samples were dominated either by α-pinene or by camphor.

## Experimental

***Plant material:*** Fifty samples of leaves and flowers of individual adult trees of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters were collected during the flowering period in March 2014 at different altitudes in Tlemcen Province (Figure 1): Coastal township : Honaïne (samples 1-4), Beni Khellad (samples 17-22), Souk Tlata (samples 23-28), Ghazaouet (samples 29-35); highlands : Sebdou (samples 5-10), Ouled Mimoun (samples 11-16), Aïn Kebira (samples 36-42) and Sabra (samples 43-50); Identification of the species was performed by Pr M. Bouazza (Lab. Ecology and Management of Natural Ecosystems, Univ. Tlemcen, Algeria). A voucher specimen has been deposited at the Laboratory of Natural Products (Department of Biology, University of Tlemcen), under the accession No. C. 46.

***Esssential oil distillation:*** Crushed leaves and flowers were submitted to hydrodistillation for 2.5 h using a Clevenger-type apparatus. Yields have been calculated from dry material.

***Analytical GC:*** GC analyses were performed on a Perkin-Elmer Clarus 500 gas chromatograph (FID) equipped with two fused silica capillary columns (50 m x 0.22 mm, 0.25 µm film thickness), BP-1 (polydimethyl siloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal at 220°C for 20 min, injector temperature: 250°C; detector temperature: 250°C; carrier gas: helium (0.8 mL/min); split: 1/60. The relative proportions of the oil constituents were expressed as percentages obtained by peak area normalization, without using correcting factors. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation ("Target Compounds" software from Perkin-Elmer).

***GC–MS analysis:*** The essential oils were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL equipped with a fused-silica capillary column (60 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 1 mL/min; split, 1/80; injection volume, 0.2 µL; injector temperature, 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermal (45 min); Ion source temperature, 150°C; energy ionisation, 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 35-350 Da.

***$^{13}$C NMR analysis:*** $^{13}$C NMR analysis was performed on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at

100.623 MHz for $^{13}C$, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform ($CDCl_3$), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). $^{13}C$ NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4 µs (flip angle 45°); acquisition time, 2.73 s for 128 K data table with a spectral width (SW) of 220 000 Hz (220 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans ranged from 2 000 – 3 000 for each sample (around 40 mg of oil in 0.5 mL of $CDCl_3$). Exponential line broadening multiplication (1.0 Hz) of the free induction decay was applied before Fourier transformation.

***Identification of components:*** Identification of the components was based: (a) on comparison of their GC retention indices (RI) on polar and apolar columns, determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software of Perkin-Elmer), with those of authentic compounds (b) on computer matching with laboratory-made and commercial mass spectral libraries [35], and (c) on comparison of the signals in the $^{13}C$ NMR spectra of essential oils with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software [36].

***Data analysis:*** Principal Components Analysis (PCA) and Hierarchical clustering (Ward's method) were performed by Xlstat (Adinsoft, France).

**Acknowledgments** - The authors gratefully acknowledge Pr. M. Bouazza (University of Tlemcen) for his help with the plant identification.

**References**


[1] Quézel P, Santa S. (**1962**) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Edition CNRS, Tome II, Paris, 34.

[2] Quézel P, Médail F. (**2003**) *Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Editions Technique et Documentation. Lavoisier, 125.

[3] Bellakhdar J, Honda G, Miki W. (**1982**) *Herb–Drugs and Herbalists in the Maghrib*. Institute of the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Tokyo.

[4] Ait Igri M, Holeman M, Ilidrissi A, Berrada M. (**1990**) Contribution à l'étude des huiles essentielles des rameaux et de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, ***24***, 36-43.

[5] Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhouchni M, Benjelloun W. (**1997**) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, ***58***, 45-54.

[6] Buhagiar JA, Podesta MTC, Wilson AP, Micallef MJ, Ali S. (**1999**) The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulata*. *Anticancer Research*, ***19***, 5435-5443.

[7] Barrero AF, Moral QD, Lucas R, Payá Ml, Akssira M, Akaad S, Mellouki F. (**2003**) Diterpenoids from *Tetraclinis articulata* that inhibit various human leukocyte functions. *Journal of Natural Products*, ***66***, 844–850.

[8] Aouinty B, Oufara S, Mellouki F, Mahari S. (**2006**) Évaluation 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). *Biotechnology. Agronomy, Society and Environment*, ***10***, 67-71.

[9] Zidane A, Tits M, Angenot L, Wauters JN, Frederich M, Dib I, Mekhfi H, Aziz M, Bnouham M, Legssyer A, Ziyyat A. (**2014**) Phytochemical analysis of *Tetraclinis articulata* in relation to its vasorelaxant property. *Journal of Material Environmental Sciences*, ***5***, 1368-1375.

[10] Bourkhiss B, Ouhssine M, Hnach M, Bourkhiss M, Satrani B, Farah A. (**2007a**) Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de *Tetraclinis articulata*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, ***146***, 75-84.

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

[12] Bourkhiss M, Hnach M, Lakhlifi T, Bourkhiss B, Ouhssine M, Satrani B. (**2010**) Production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, ***79***, 4-11.

[13] Bourkhiss M, Hnach M, Lakhlifi T, Bouachrine M, Farah A, Satrani B, Ouhssine M, Chaouch A, Costa J. (**2012**) Fractionnement et valorisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Phytothérapie*, ***10***, 222-228.

[14] Abi-Ayad FZ, Abi-Ayad M, Lazouni HA, Rebiahi SA, Bessiere (**2011**) Antibacterial activity of essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Algeria flora. *Journal of Microbiology Biotechnology Research*, ***1***, 1-6.

[15] Abi-Ayad FZ, Abi-Ayad M, Lazouni HA, Rebiahi SA. (**2013**) Evaluation of *Tetraclinis articulata* essential oil from Algeria flora as a potential source of antifungal activity and study of its chemical composition. *Indian Academy of Wood Science*, ***10***, 9-15.

[16] Tékaya-Karoui A, Boughalleb N, Hammami S, Ben Jannet H, Mighri Z. (**2011**) Chemical composition and antifungal activity of volatile components from woody terminal branches and roots of *Tetraclinis articulata* (Vahl.) Masters growing in Tunisia. *African Journal of Plant Science*, ***5***, 115-122.

[17] Satrani B, Farah M, Talbi M. (**2004**) Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle extraite du bois de *Tetraclinis articulata* du Maroc. *Annales des Falsification et de l'Expertise Chimique*, ***964***, 75-84.

[18] El Moussaouiti M, Talbaoui A, Gmouh S, Aberchane M, Benjouad A, Bakri Y, Kamdem DP. (**2010**) Chemical composition and bactericidal evaluation of essential oil of *Tetraclinis articulata* Burl wood from Morocco. *Indian Academy of Wood Science*, ***7***, 14-18.

[19] Chikhoune A, Hazzit M, Kerbouche L, Baaliouamer A, Aissat K. (**2013**) *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils : Chemical composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, ***25***, 300-307.

[20] Bouayad Alam S, Gaouar Benyelles N, Dib M. ElA, Djabou N, Tabti L, Paolini J, Muselli A, Costa J. (**2014**) Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, ***87***, 56-61.

[21] Bourkhiss M, Hnach M, Paolini J, Costa J, Farah A, Satrani B. (**2010**) Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège,* ***79***, 141-154.

[22] Djouahri A, Boudarene L, Meklati BY. (**2013**) Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Industrial Crops and Products*, ***44***, 32-36.

[23] Bourkhiss M, Hnach M, Paolini J, Costa J, Chaouch A. (**2009**) Composition chimique des huiles essentielles de la sciure de bois et de feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège,* ***78***, 281-289.

[24] Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Quilez J, Akssira M, Mellouki F, Akkad S. (**2005**) Chemical composition of the essential oils of leaves and wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Journal of Essential Oil Research*, ***17***, 166-168.

[25] Zrira S, Benjilali B, Elamrani A. (**2005**) Chemical composition of the sawdust oil of Moroccan *Tetraclinis articulata* Vahl. *Journal of Essential Oil Research*, ***17***, 96-97.

[26] Buhagiar J, Podesta MTC, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. (**2000**) Essential oil composition of different parts of *Tetraclinis articulata*. *Journal of Essential Oil Research*, ***12***, 29-32.

[27] Tékaya-Karoui A, Ben Jannet H, Mighri Z. (**2007**) Essential oil composition of terminal branches, cones and roots of *Tetraclinis articulata* from Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, ***10***, 2495-2499.

[28] Bourkhiss B., Ouhssine M., Hnach M., Amechrouq A., Chaouch A., Satrani B. (**2007**) Composition chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Physical & Chemical News*, ***35***, 128-132.

[29] Kiliç Ö. (**2014**) Essential oil composition of two *Thuja* L. (Cupressaceae) species from Canada. *Muş Alparslan University Journal of Science*, ***2***, 195-199.

[30] Achak N, Romane A, Alifriqui M, Markouk M. (**2009**) Chemical composition, organic and mineral contents of leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from the Tensift-Al Haouz, Marrakech region (Morocco). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, ***12***, 198-204.

[31] Ben Jemia M, Chaabane S, Senatore F, Bruno M, Kchouk ME. (**2013**) Studies on the antioxidant activity of the essential oil and extract of Tunisian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. (Cupressaceae). *Natural Product Research*, ***27***, 1419-30.

[32] Herzi N, Camy S, Bouajila J, Destrac P, Romdhane M, Condoret J-S. (**2013**) Supercritical $CO_2$ extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, ***82***, 72-82.

[33] Benali Toumi F, Benyahia M, Hamel L, Mohamedi H, Boudaghen L. (**2011**) Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie. *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, ***158***, 93-100.

[34] Farah A, Bouayoun T, Ghanmi M, El Bouri A, Bourkhiss B, Houari A, Satrani B. (**2010**) Chemical constituents of essential oils of wood and wood veneers of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, ***13***, 420-425.

[35] (a) US National Institute of Standards and Technology PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, Norwalk, CT (**1999**); (b) König WA, Hochmuth DH, Joulain D. (**2001**) Terpenoids and related constituents of essential oils, library of Massfinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg; (c) Adams RP. (**2007**) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

[36] (a) Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. (**1995**) Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, ***1***, 25-34; (b) Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. (**2002**) Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using $^{13}C$ NMR spectroscopy. *Journal Applied Spectroscopy*, ***56***, 312-317; (c) Ouattara ZA, Boti JB, Ahibo AC, Sutour S, Casanova J, Tomi F, Bighelli A. (**2014**) The key role of $^{13}C$ NMR analysis in the identification of individual components of *Polyalthia longifolia* leaf oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***29***, 371-379.

**Red Maple (*Acer rubrum*) Aerial Parts as a Source of Bioactive Phenolics**
Yan Zhang, Hang Ma, Tao Yuan and Navindra P. Seeram **1409**

**Changes in the Content of the Glycosides, Aglycons and their Possible Precursors of *Rhodiola rosea* during the Vegetation Period**
Iman Mirmazloum, Márta Ladányi and Zsuzsanna György **1413**

**Biocompounds Attenuating the Development of Obesity and Insulin Resistance Produced by a High-fat Sucrose Diet**
Usune Etxeberria, Ana Laura de la Garza, J. Alfredo Martínez and Fermín I. Milagro **1417**

**A Novel C21 Cyclopentenone Derivative from *Cipadessa cinerascens***
Jing Zhang, Yao-Wen Chang, Chun-Mao Yuan, Fan Zhang, Ying-Tong Di and Xiao-Jiang Hao **1421**

**Effects on MC3T3-E1 Cells and *In silico* Toxicological Study of Two 6-(Propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones**
Marija Vukelić-Nikolić, Ana Kolarević, Katarina Tomović, Denitsa Yancheva, Emiliya Cherneva, Stevo Najman, and Andrija Šmelcerović **1423**

**Release of Antioxidant Peptides from the Body Wall Proteins of the Sea Cucumber *Isostichopus fuscus***
Arisaí C. Hernández-Sámano and Blanca Hernández-Ledesma **1427**

**Bioactivity-guided Separation of the Active Compounds in *Acacia pennata* Responsible for the Prevention of Alzheimer's Disease**
Pattamapan Lomarat, Sirirat Chancharunee, Natthinee Anantachoke, Worawan Kitphati, Kittisak Sripha and Nuntavan Bunyapraphatsara **1431**

**Development and Validation of LC-MS/MS Method for Quantitative Determination of Adenosine, Guanosine, Xanthine and Uric acid in Widely Consumed Vegetables in Thailand**
Narisa Rukdee, Piyanuch Rojsanga and Chutima Matayatsuk Phechkrajang **1435**

**Chemical Composition of the Essential Oil from *Chaerophyllum temulum* (Apiaceae)**
Jelena G. Stamenković, Gordana S. Stojanović, Ivana R. Radojković, Goran M. Petrović and Bojan K. Zlatković **1439**

**Comparison of Essential Oils Obtained from Different Extraction Techniques as an Aid in Identifying Aroma Significant Compounds of Nutmeg (*Myristica fragrans*)**
Suchandra Chatterjee, Sumit Gupta and Prasad. S. Variyar **1443**

**Chemical Variability of the Essential Oil Isolated from Aerial Parts of *Tetraclinis articulata* from North-Western Algeria**
Maghnia Boussaïd, Chahrazed Bekhechi, Fawzia Beddou, Daoudi Chabane Sari, Ange Bighelli, Joseph Casanova and Félix Tomi **1447**

**Composition and Bioactivities of an (*E*)-β-Farnesene Chemotype of Chamomile (*Matricaria chamomilla*) Essential Oil from Nepal**
Prabodh Satyal, Samon Shrestha and William N. Setzer **1453**

**Chemical Composition of the Essential Oil from *Croton oblongifolius* and its Antibacterial Activity against *Propionibacterium acnes***
Sirivan Athikomkulchai, Sarin Tadtong, Nijsiri Ruangrungsi and Tapanee Hongratanaworakit **1459**

**Composition, *in vitro* Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils from Leaf and Twig Parts of *Cupressus cashmeriana***
Yu-Chang Su, Kuan-Ping Hsu, Kuo-Feng Hua and Chen-Lung Ho **1461**

**Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Essential Oils of *Cinnamomum griffithii* and *C. macrocarpum***
Wan Mohd Nuzul Hakimi Wan Salleh, Farediah Ahmad and Khong Heng Yen **1465**

**Essential Oil Composition and Antigermination Activity of *Artemisia dracunculus* (Tarragon)**
Daniele Fraternale, Guido Flamini and Donata Ricci **1469**

***In Vitro* Activity of Twenty Commercially Available, Plant-Derived Essential Oils against Selected Dermatophyte Species**
Simona Nardoni, Silvia Giovanelli, Luisa Pistelli, Linda Mugnaini, Greta Profili, Francesca Pisseri and Francesca Mancianti **1473**

**Intracerebral Distribution of α-Pinene and the Anxiolytic-like Effect in Mice Following Inhaled Administration of Essential Oil from *Chamaecyparis obtusa***
Hikaru Kasuya, Sayuka Iida, Kurumi Ono, Tadaaki Satou and Kazuo Koike **1479**

## *Accounts/Reviews*

**A Comprehensive Review of the Cosmeceutical Benefits of *Vanda* Species (Orchidaceae)**
Hazrina Hadi, Syarifah Nazira Said Razali and Ammar Ihsan Awadh **1483**

**Genotoxicity and Antigenotoxicity Studies of Traditional Medicinal Plants: How Informative and Accurate are the Results?**
Luc Verschaeve **1489**

# Natural Product Communications
# 2015
Volume 10, Number 8

## Contents

***Original Paper***

**Isolation of Monovalerianester A, an Inhibitor of Fat Accumulation, from *Valeriana fauriei***
Keiji Yuki, Mariko Ikeda, Shosuke Yoshida, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Kaoru Yamada, Daisuke Uemura and Kenji Miyamoto **1333**

**Arthropod Deterrents from *Artemisia pallens* (Davana Oil) Components**
Ganga V. Bhagavathy, Glory M Velazquez Nieves, Meiling Z. Webb and Kamlesh R. Chauhan **1335**

**Stereoselective Synthesis of 2,15-Dihydroxycalamenene and 2-Methoxycalamenene. Determination of the Configuration of Natural 2,15-Dihydroxycalamenene**
Stefano Serra **1337**

**Sesquiterpenes from the Vietnamese Marine Sponge *Dysidea fragilis***
Nguyen Thi Cuc, Hoang Le Tuan Anh, Dan Thi Thuy Hang, Nguyen Xuan Nhiem, Nguyen Hai Dang, Nguyen Hoai Nam, Pham Hai Yen, Do Cong Thung, Vu Kim Thu, Chau Van Minh and Phan Van Kiem **1341**

**Vibrational Circular Dichroism Absolute Configuration of 9,12-Cyclomulin-13-ol, a Diterpene from *Azorella* and *Laretia* Species**
Marcelo A. Muñoz, Aurelio San-Martín and Pedro Joseph-Nathan **1343**

**Ultrafine Betulin Formulation with Biocompatible Carriers Exhibiting Improved Dissolution Rate**
Svetlana A. Myz, Tatyana P. Shakhtshneider, Mikhail A. Mikhailenko, Andrey G. Ogienko, Ekaterina G. Bogdanova, Anna A. Ogienko, Svetlana A. Kuznetsova, Elena V. Boldyreva and Vladimir V. Boldyrev **1345**

**Bio-assay Guided Isolation of Anti-cancer Compounds from *Anthocephalus cadamba* Bark**
Deepak Kumar, Chilukuri Tejaswi, Saiprasanna Rasamalla, Sumana Mallick and Bikas C Pal **1349**

**Damarane-*type* Saponins from *Gynostemma longipes* and their Cytotoxic Activity**
Pham Tuan Anh, Pham Thanh Ky, Nguyen Thi Cuc, Nguyen Xuan Nhiem, Pham Hai Yen, Tran Minh Ngoc, Hoang Le Tuan Anh, Bui Huu Tai, Do Thi Trang, Chau Van Minh and Phan Van Kiem **1351**

**A New $C_{23}$ Steroid from the Venom of *Bufo bufo gargarizans***
Shi-Lin Luo, Hai-Yan Tian, Jun-Shan Liu, Ying Wang and Wen-Cai Ye **1353**

**(-)-Pentylsedinine, a New Alkaloid from the Leaves of *Lobelia tupa* with Agonist Activity at Nicotinic Acetylcholine Receptor**
Cristian Paz, José Becerra, Mario Silva, Viviana Burgos, Matthias Heydenreich, Bernd Schmidt, Thu Tran and Irina Vetter **1355**

**Furoquinoline Alkaloids from the Leaves of *Evodia lepta* as Potential Cholinesterase Inhibitors and their Molecular Docking**
Jirapast Sichaem, Thanawan Rojpitikul, Pattara Sawasdee, Kiattisak Lugsanangarm and Santi Tip-pyang **1359**

**Asperginine, an Unprecedented Alkaloid from the Marine-derived Fungus *Aspergillus* sp.**
Pinmei Wang, Shizhe Zhao, Ying Liu, Wanjing Ding, Feng Qiu and Jinzhong Xu **1363**

**Effect of Quercetin on Cell Cycle and Cyclin Expression in Ovarian Carcinoma and Osteosarcoma Cell Lines**
Daniela Catanzaro, Eugenio Ragazzi, Caterina Vianello, Laura Caparrotta and Monica Montopoli **1365**

**Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Four *Alchemilla* Species (Rosaceae)**
Marija Krivokuća, Marjan Niketić, Marina Milenković, Nataša Golić, Carla Masia, Maria Maddalena Scaltrito, Francesca Sisto and Tatjana Kundaković **1369**

**Peracylated Glucosyl Kaempferols from *Pasania dodoniifolia* Leaf**
Chi-Chih Chang and Shoei-Sheng Lee **1373**

**6-Methoxyflavonol Glycosides with *In Vitro* Hepatoprotective Activity from *Chenopodium bonus-henricus* Roots**
Zlatina Kokanova-Nedialkova, Magdalena Kondeva-Burdina, Dimitrina Zheleva-Dimitrova, Virginia Tzankova, Stefan Nikolov, Jörg Heilmann and Paraskev T. Nedialkov **1377**

**Flavonol Glycosides from the Leaves of *Allium macrostemon***
Risa Nakane and Tsukasa Iwashina **1381**

**HPLC Plasma Assay of a Novel Anti-MRSA Compound, Kaempferol-3-*O*-Alpha-L-(2",3"-di-*p*-coumaroyl)rhamnoside, from Sycamore Leaves**
Yiguan Zhang, Frederick Valeriote, Kenneth Swartz, Ben Chen, Mark T. Hamann, Douglas L. Rodenburg, James D. McChesney and Jiajiu Shaw **1383**

**Biological Activity of *Dolichandrone serrulata* Flowers and Their Active Components**
Phanida Phanthong, Noppawan Phumala Morales, Sirirat Chancharunee, Supachoke Mangmool, Natthinee Anantachoke and Nuntavan Bunyapraphatsara **1387**

**Prenylhydroquinone-Derived Secondary Metabolites from Cultures of the Basidiomycete *Lentinus similis* BCC 52578**
Masahiko Isaka, Somporn Palasarn, Malipan Sappan, Kitlada Srichomthong, Samantha C. Karunarathna and Kevin D. Hyde **1391**

**Effects of Thymoquinone on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Glibenclamide in a Rat Model**
Ajaz Ahmad, Rao Muzaffar A. Khan, Khalid M. Alkharfy, Mohammad Raish, Fahad I. Al-Jenoobi, and Abdullah M. Al-Mohizea **1395**

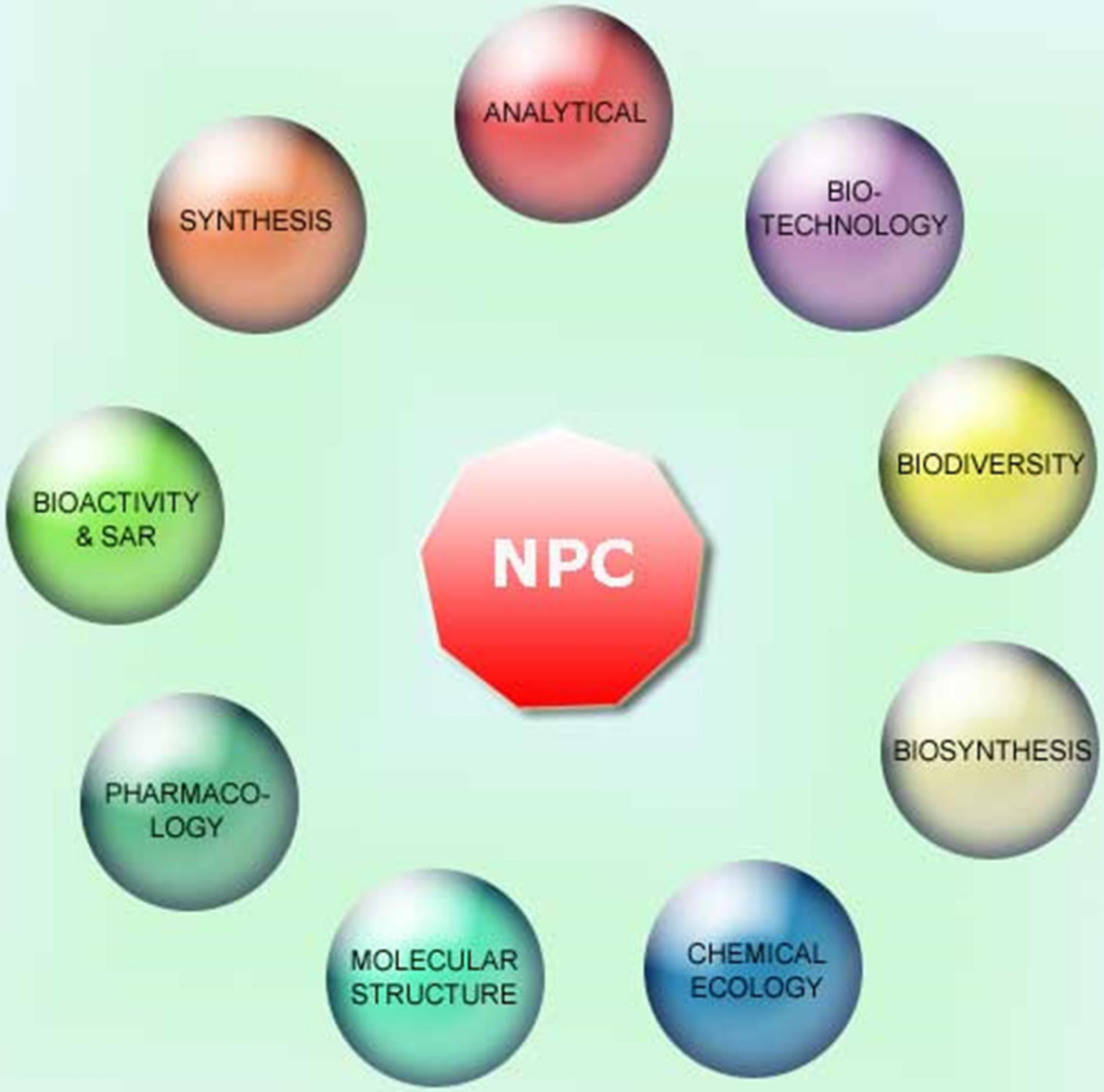
**Antioxidant and Antiinflammatory Compounds in Nutmeg (*Myristica fragrans*) Pericarp as Determined by *in vitro* Assays**
Chuan-Rui Zhang, Ettannil Jayashree, Paramasivam Suresh Kumar and Muraleedharan G. Nair **1399**

***In Vitro* Safety/Protection Assessment of Resveratrol and Pterostilbene in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2)**
Germana Lombardi, Samuele Vannini, Francesca Blasi, Maria Carla Marcotullio, Luca Dominici, Milena Villarini, Lina Cossignani and Massimo Moretti **1403**

*Continued inside backcover*

# NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

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




**This Issue is Dedicated to**
**Professor Dr DHC Yoshinori Asakawa**
**On the Occasion of his 75th Birthday**

Volume 11. Issue 8. Pages 1057-1206. 2016
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

**NPC** **Natural Product Communications**

**EDITOR-IN-CHIEF**

**DR. PAWAN K AGRAWAL**
*Natural Product Inc.*
*7963, Anderson Park Lane,*
*Westerville, Ohio 43081, USA*
*agrawal@naturalproduct.us*

**HONORARY EDITOR**

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

**EDITORS**

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

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

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

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

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

**PROFESSOR STEPHEN G. PYNE**
*Department of Chemistry, University of Wollongong,*
*Wollongong, New South Wales, 2522, Australia*
*spyne@uow.edu.au*

**PROFESSOR MANFRED G. REINECKE**
*Department of Chemistry, Texas Christian University,*
*Forts Worth, TX 76129, USA*
*m.reinecke@tcu.edu*

**PROFESSOR WILLIAM N. SETZER**
*Department of Chemistry, The University of Alabama in Huntsville,*
*Huntsville, AL 35809, USA*
*wsetzer@chemistry.uah.edu*

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

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

**ADVISORY BOARD**

Prof. Viqar Uddin Ahmad
*Karachi, Pakistan*

Prof. Giovanni Appendino
*Novara, Italy*

Prof. Yoshinori Asakawa
*Tokushima, Japan*

Prof. Roberto G. S. Berlinck
*São Carlos, Brazil*

Prof. Anna R. Bilia
*Florence, Italy*

Prof. Josep Coll
*Barcelona, Spain*

Prof. Geoffrey Cordell
*Chicago, IL, USA*

Prof. Fatih Demirci
*Eskişehir, Turkey*

Prof. Francesco Epifano
*Chieti Scalo, Italy*

Prof. Ana Cristina Figueiredo
*Lisbon, Portugal*

Prof. Cristina Gracia-Viguera
*Murcia, Spain*

Dr. Christopher Gray
*Saint John, NB, Canada*

Prof. Dominique Guillaume
*Reims, France*

Prof. Duvvuru Gunasekar
*Tirupati, India*

Prof. Hisahiro Hagiwara
*Niigata, Japan*

Prof. Judith Hohmann
*Szeged, Hungary*

Prof. Tsukasa Iwashina
*Tsukuba, Japan*

Prof. Leopold Jirovetz
*Vienna, Austria*

Prof. Phan Van Kiem
*Hanoi, Vietnam*

Prof. Niel A. Koorbanally
*Durban, South Africa*

Prof. Chiaki Kuroda
*Tokyo, Japan*

Prof. Hartmut Laatsch
*Gottingen, Germany*

Prof. Marie Lacaille-Dubois
*Dijon, France*

Prof. Shoei-Sheng Lee
*Taipei, Taiwan*

Prof. Imre Mathe
*Szeged, Hungary*

Prof. M. Soledade C. Pedras
*Saskatoon, Canada*

Prof. Luc Pieters
*Antwerp, Belgium*

Prof. Peter Proksch
*Düsseldorf, Germany*

Prof. Phila Raharivelomanana
*Tahiti, French Polynesia*

Prof. Luca Rastrelli
*Fisciano, Italy*

Prof. Stefano Serra
*Milano, Italy*

Dr. Bikram Singh
*Palampur, India*

Prof. John L. Sorensen
*Manitoba, Canada*

Prof. Johannes van Staden
*Scottsville, South Africa*

Prof. Valentin Stonik
*Vladivostok, Russia*

Prof. Ping-Jyun Sung
*Pingtung, Taiwan*

Prof. Winston F. Tinto
*Barbados, West Indies*

Prof. Sylvia Urban
*Melbourne, Australia*

Prof. Karen Valant-Vetschera
*Vienna, Austria*

## INFORMATION FOR AUTHORS

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

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

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

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

NPC Natural Product Communications

2016
Vol. 11
No. 8
1167 - 1170

# Composition and Chemical Variability of the Cone Oil from Algerian *Tetraclinis articulata*

**Maghnia Boussaïd[a], Chahrazed Bekhechi[a], Fewzia Atik-Bekkara[a], Mathieu Paoli[b], Joseph Casanova[b] and Félix Tomi[b]***

[a]*Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algeria*
[b]*Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France*

*felix.tomi@univ-corse.fr*

**Received: December 31st, 2015 ; Accepted: June 24th, 2016**

Very little is known about the yield and chemical composition of the essential oil isolated from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae). In continuation of our on-going work devoted to the valorisation of medicinal and aromatic plants from Tlemcen Province (North-Western Algeria), cones have been harvested in eight locations (coastal township and highlands) and 40 oil samples have been isolated by hydrodistillation. Six oil samples were analyzed by a combination of chromatographic [GC(Retention indices)] and spectroscopic techniques (GC-MS, $^{13}$C NMR). Then, the remaining 34 oil samples were analyzed by [GC(RI)] and $^{13}$C NMR and the 40 compositions were submitted to statistical analysis. Essential oil yields varied substantially from sample to sample (0.17 to 1.13%, w/w). The cone oils consisted mainly of monoterpenes, with α-pinene (47.1-73.6%) and limonene (6.5-21.9%) being the main components. *(E)*-β-Caryophyllene and germacrene D were the major sesquiterpenes. Diterpenes, (*Z*) and (*E*)-biformene were identified for the first time in *T. articulata* essential oil. PCA analysis of the data allowed the distinction of two groups, the second group being sub-divided into two sub-groups. Groups and sub-groups were differentiated with respect to their contents of α-pinene and limonene and, to a lesser extent, of sesquiterpenes.

**Keywords:** *Tetraclinis articulata*, Cupressaceae, Cone oil, Essential oil composition, Yield variability, Chemical variability, $^{13}$C NMR, Statistical analysis.

*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Cupressaceae family, synonyms: *C. articulata* (Vahl) Link and *Callitris quadrivalvis* Vent.) is found in Europe on the coast of southeastern Spain and in Malta [1,2]. It is widespread in North Africa, in Morocco (from north of Rif to Anti-Atlas) in Tunisia, (between Bizerte and Zaghouan) and in Algeria (north-western part of the country and particularly in Tlemcen Province) [2].

*T. articulata*, commonly known as "Ahrar", is a shrub or small tree with glaucous, pruinose and tetragonal cones [1]. It has been used in folk medicine [3-5], and various biological activities have been reported for extracts and essential oils; these have been summarized in a previous paper [6].

Different parts of *T. articulata* (leaves, twigs, branches, cones, roots, wood and sawdust) produce by hydrodistillation an essential oil whose composition has been widely investigated. A strong chemical variability has been observed, depending mainly on the part of the plant exploited and the country of harvest. In short, leaf oils contained mainly monoterpenes and in contrast wood oils and sawdust oils contained more sesquiterpenes and phenylpropanoids. The various compositions of *T. articulata* essential oils have been reviewed in our previous paper [6].

In continuation of our on-going work devoted to the valorization of aromatic and medicinal plants from Western Algeria [7,8], we recently investigated the chemical composition of the essential oil isolated from aerial parts of *T. articulata* and we demonstrated the occurrence of a fair chemical variability. Two main groups have been distinguished, the composition of the first being dominated by camphor and α-pinene. Group II was subdivided into two sub-groups. Samples of sub-group IIA exhibited a high content of α-pinene. Samples of the largest group, IIB, were characterized by similar contents of α-pinene and bornyl acetate [6].

Therefore, in order to contribute to the valorization of *T. articulata* under various aspects, including the industrial production of essential oil, we investigated the chemical composition and the chemical variability of the essential oil isolated from cones of this plant growing wild in Western Algeria. Three studies devoted to *T. articulata* cone oil showed various compositions depending on the location of harvest:

- A cone oil sample from Malta contained mainly α-pinene (68.2%) and limonene (16.6%) [9].
- Tunisian cone oil contained various components in appreciable amounts *p*-cymen-8-ol (10.4%), *trans*-pinocarveol (6.1%), fenchyl acetate (5.1%) and carvone (5.3%) [10].
- Two Algerian *T. articulata* cone oil samples have been investigated, one isolated from cones harvested in Hammam Melouane (40 km South of Algiers) and one in Tipaza (70 km West of Algiers). They were characterized by a high content of α-pinene (57.5% and 75.0%), followed by limonene (20.9% and 10.6%) [11]. Both samples displayed a similarity with cone oils from Malta, but, in contrast, they differed from Tunisian cone oil.

So, the aim of the present study was to characterize the essential oil isolated from cones of *T. articulata* growing wild in the Province of Tlemcen (Algeria). For that purpose, forty oil samples have been isolated from plants harvested in eight locations and analyzed. The 40 compositions have been submitted to statistical analysis in order to determine if *T. articulata* produces homogeneous oil or if there is evidence of chemical variability.

We will first report on the detailed analysis of six cone oil samples selected on the basis of their chromatographic profile and carried out by combination of chromatographic and spectroscopic techniques (Table 1). Then the results of the statistical analysis will be developed.

**Table 1:** Chemical compositions of selected *Tetraclinis articulata* cone oils.

| Compounds[a] | RIa[b] | RIp[c] | Sab6 | Sab10 | AK12 | G40 | H16 | S30 | Identification mode |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tricyclene | 918 | 1016 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | RI, MS |
| α-Pinene | 929 | 1016 | 62.4 | 47.1 | 73.6 | 55.0 | 55.9 | 68.4 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Camphene | 941 | 1063 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | RI, MS |
| Sabinene | 962 | 1121 | 0.8 | 0.4 | 0.7 | 0.8 | 0.5 | 0.5 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| β-Pinene | 968 | 1110 | 2.0 | 1.6 | 1.8 | 1.3 | 1.9 | 1.7 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Myrcene | 978 | 1159 | 11.6 | 6.1 | 4.8 | 2.1 | 4.2 | 1.7 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| δ-3-Carene | 1003 | 1147 | 0.1 | 0.5 | 0.4 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | RI, MS |
| α-Terpinene | 1007 | 1179 | 0.1 | Tr | 0.1 | 0.1 | 0.1 | Tr | RI, MS |
| *p*-Cymene | 1009 | 1269 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.3 | RI, MS |
| Limonene* | 1019 | 1200 | 9.2 | 6.9 | 8.7 | 21.6 | 11.5 | 7.5 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| β-Phellandrene* | 1019 | 1209 | 0.6 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| γ-Terpinene | 1046 | 1243 | 0.1 | 0.1 | 0,1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| Terpinolene | 1076 | 1280 | 0.9 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.4 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Campholenal | 1102 | 1488 | Tr | 0.4 | 0.5 | 1.1 | 0.8 | 2.4 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Camphor | 1118 | 1514 | 0.3 | 0.1 | 0.2 | 0.5 | 0.2 | 0.1 | RI, MS |
| *trans*-Pinocarveol | 1121 | 1651 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.7 | 0.5 | 1.2 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| *trans*-Verbenol | 1125 | 1674 | 0.1 | 0.1 | 0.3 | 1.0 | 0.1 | 0.5 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Borneol | 1146 | 1696 | 0.2 | 0.1 | Tr | Tr | 0.1 | Tr | RI, MS |
| Terpinen-4-ol | 1158 | 1598 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.6 | 0.5 | 0.3 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Terpineol | 1169 | 1696 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | RI, MS |
| Perrilaldehyde | 1242 | 1784 | 0.1 | 0.2 | Tr | 0.1 | 1.0 | 0.1 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Bornyl acetate | 1266 | 1576 | 1.1 | 2.4 | 0.8 | 1.1 | 2.5 | 2.0 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Terpinyl acetate | 1329 | 1692 | 1.4 | 2.1 | 0.8 | 2.0 | 3.0 | 2.3 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Copaene | 1372 | 1486 | 0.2 | 1.1 | 0.5 | 0.1 | 0.2 | - | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| β-Elemene | 1384 | 1585 | 0.1 | 0.2 | - | - | 0.2 | - | RI, MS |
| Siberene | 1396 | 1545 | 0.2 | 1.7 | 0.8 | 0.1 | 0.3 | - | RI, MS |
| *(E)*-β-Caryophyllene | 1413 | 1591 | 1.3 | 6.3 | 0.3 | 2.6 | 4.0 | 1.1 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Humulene | 1446 | 1663 | 0.4 | 1.7 | 0.1 | 0.7 | 1.1 | 0.5 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| γ-Muurolene | 1466 | 1681 | 0.1 | 0.2 | Tr | - | Tr | - | RI, MS |
| Germacrene D | 1472 | 1702 | 3.2 | 6.1 | 0.7 | 0.1 | 0.4 | 0.4 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| γ-Cadinene | 1502 | 1752 | 1.1 | 3.4 | 0.5 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| δ-Cadinene | 1510 | 1750 | 0.2 | 0.8 | 0.2 | Tr | 0.1 | 0.1 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| α-Cadinene | 1526 | 1781 | Tr | 0.2 | Tr | - | - | - | RI, MS |
| Caryophyllene oxide | 1565 | 1974 | Tr | 1.8 | Tr | 1.6 | 2.7 | 0.6 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| *epi*-Cubenol | 1611 | 2056 | 0.1 | 1.0 | 0.3 | 0.1 | 0.3 | - | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| τ-Cadinol | 1621 | 2162 | 0.1 | 0.6 | 0.1 | - | Tr | - | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| *(Z)*-Biformene | 1971 | 2312 | Tr | 0.8 | Tr | 0.1 | 0.2 | 0.2 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| *(E)*-Biformene | 1997 | 2357 | Tr | 0.6 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | RI, MS, $^{13}$C NMR |
| Total (%) | | | 99.0 | 96.5 | 98.3 | 95.7 | 95.0 | 94.1 | |

[a]) Order of elution and percentages are given on apolar column (BP-1) except those with an asterisk, percentage on polar (BP-20) column. [b]) $RI_a$: Retention indices measured on apolar column. [C]) $RI_p$: Retention indices measured on polar column. Tr: Trace. $^{13}$C NMR: components identified by NMR at least in one oil sample.

***Chemical composition of selected oil samples.*** Identification of individual components was carried out by GC (with retention indices on two columns of different polarity, RI), by GC-MS and by $^{13}$C NMR, following a computerized method developed in our laboratories [12]. In total, 38 compounds were identified, accounting for 94.1-99.0% of the whole compositions (Table 1). Identification of 25 out of 38 components was ensured by $^{13}$C NMR. The six oil samples contained predominantly monoterpene hydrocarbons and oxygenated monoterpenes. However, the contents of the major components (α-pinene, myrcene, limonene) varied substantially from sample to sample. A few sesquiterpenes were found in appreciable contents: siberene, *(E)*-β-caryophyllene, α-humulene, germacrene D, γ-cadinene and caryophyllene oxide. Finally, two diterpenes have been suggested by MS and their identification was confirmed by $^{13}$C NMR.

***Chemical variability.*** Forty samples of essential oil were obtained by water-distillation of cones from individual trees of *T. articulata* collected in eight locations in Tlemcen Province (altitude 42 m-1210 m). The yields of cone oil (w/w) calculated from dry material, varied drastically from sample to sample (0.17-1.13%), although they were higher than those obtained with aerial parts (0.03-0.86%) [6]. Large variations were observed within a location, for instance 0.19-0.91% in Souk Tlata and 0.26-1.13% in Sebdou) (Table 2). In contrast, homogeneity of the mean yield values should be noted with mean yields comprised between 0.53% and 0.63% for five locations out of eight.

**Table 2:** Yields (%) of essential oils isolated from cones of *Tetraclinis articulata* harvested in Tlemcen Province.

| | | Essential oil yield | | |
|---|---|---|---|---|
| Location of harvest | Altitude | Mean±SD (%) | Min (%) | Max (%) |
| Ghazaouet | 42 | 0.78±0.24 | 0.53 | 1.11 |
| Honaïne | 165 | 0.24±0.06 | 0.17 | 0.34 |
| Beni Khellad | 408 | 0.59±0.10 | 0.50 | 0.75 |
| Sabra | 495 | 0.43±0.28 | 0.23 | 0.91 |
| Souk Tlata | 497 | 0.54±0.28 | 0.19 | 0.91 |
| Ouled Mimoun | 768 | 0.53±0.12 | 0.40 | 0.64 |
| Aïn Kebira | 779 | 0.59±0.19 | 0.33 | 0.86 |
| Sebdou | 1210 | 0.63±0.43 | 0.26 | 1.13 |

SD : standard deviation, Min : minimum, Max : maximum

The 34 remaining cone oil samples were submitted to GC(FID) analysis and retention indices (RIs) of individual components were measured on two columns of different polarity. The 38 components, accounting for 91.4-99.0% of the whole oil compositions were taken into account in the statistical analysis. Monoterpenes were the main constituents of all samples. However, the concentration of the two major components varied substantially from sample to sample; α-pinene (47.1-73.6%) and limonene (6.5-21.9%) (Table 3). In agreement with the five compositions previously described myrcene (up to 11.6%) was the other monoterpene present in appreciable content. *(E)*-β-Caryophyllene (up to 6.3%) and germacrene D (up to 6.1%) were the major sesquiterpenes identified in *T. articulata* cone oil. Concerning diterpenes, (*Z*) and (*E*)-biformene reached 0.8% and 0.6%, respectively. The major components are reported in Table 3.

A combination of a hierarchical clustering dendrogram (Figure 1) and principal components analysis (PCA) (Figure 2), in which the

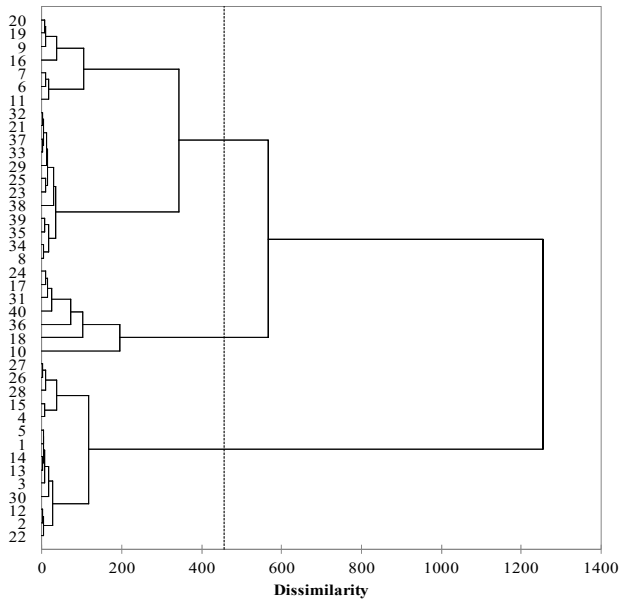



**Figure 1:** Dendrogram obtained from the cluster analysis of 40 samples of *Tetraclinis articulata* cone oil from Tlemcen Province (Algeria).

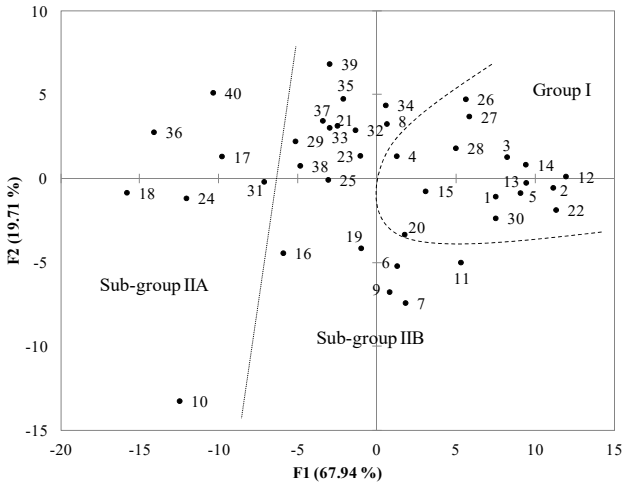



**Figure 2:** PCA scatterplot of 40 essential oil samples of *Tetraclinis articulata* from Tlemcen Province (Algeria).

plan defined by the two first axes described 87.65% of the total variance of the population, suggested the existence of two principal groups, which were differentiated on the basis of α-pinene, limonene and myrcene contents. In parallel, group II was divided into two subgroups IIA and IIB. The samples of group I (14 of 40 samples) were characterized by a very high content of α-pinene [Mean (SD): 69.7% (2.8); Min-Max: 64.0-73.6%)], followed by limonene [10.6% (2.6); 7.3-15.4%]. Other components were present in very low content (mean values less than 2%), myrcene excepted [3.9% (1.2); 1.7-5.6%]. Group II, containing 26 samples, was characterized by a lower content of α-pinene, although this component remained the major one. In fact, it should be sub-divided into two sub-groups, IIA (7 oil samples) and IIB (19 oil samples). The content of α-pinene [51.9% (3.3); 47.1-56.0%] in samples of IIA was the lowest observed. As expected, the contents of the other components increased with respect to those of Group I: limonene [17.1% (5.0); 6.9-21.9%], α-terpinyl acetate [2.6% (0.8); 1.7-4.1%], *(E)*-β-caryophyllene [2.9% (2.1); 0.3-6.3%] and germacrene D [2.5% (2.0); 0.1-6.1%].

Finally, sub-group IIB contained 19 oil samples out of 40. The contents of α-pinene [61.6% (2.3); 55.9-65.7%] and limonene [13.9% (4.4); 6.5-20.6%] are located between those of group I and those of sub-group IIA. The same remark is applicable to oxygenated monoterpenes and sesquiterpene hydrocarbons.

Considering the two cone oil compositions from *T. articulata* growing in the area of Algiers, the first one may be attributed to group I and the second one to group IIA [11]. The cone oil from Malta that displayed also α-pinene (68.2%) and limonene (16.6%) as major components differed from Algerian oils by its high content of α-terpineol (4.9%) [9]. In contrast, the composition of Tunisian cone oil (*p*-cymen-8-ol, 10.4%; *trans*-pinocarveol, 6.1%; fenchyl acetate, 5.1% and carvone, 5.3%) differed drastically from those of all Algerian samples [10].

In conclusion, cones from *T. articulata* growing wild in the Province of Tlemcen (Algeria) produced an essential oil whose composition is largely dominated by α-pinene, followed by limonene. However, three types of compositions may be distinguished, based on the contents of α-pinene and limonene. Therefore, the 40 oil samples were separated into two groups of

**Table 3:** Chemical variability of *Tetraclinis articulata* essential oil isolated from cones: Main components of 40 samples.

| Constituents | Group I (14 samples) | | | | Group II (26 samples) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Sub-group IIA (7 samples) | | | | Sub-group IIB (19 samples) | | | |
| | Mean | S D | Min | Max | Mean | S D | Min | Max | Mean | S D | Min | Max |
| α-Pinene | 69.7 | 2.8 | 64.0 | 73.6 | 51.9 | 3.3 | 47.1 | 56.0 | 61.6 | 2.3 | 55.9 | 65.7 |
| β-Pinene | 1.8 | 0.2 | 1.5 | 2.5 | 1.5 | 0.1 | 1.3 | 1.7 | 1.7 | 0.2 | 1.3 | 2.0 |
| Myrcene | 3.9 | 1.2 | 1.7 | 5.6 | 4.4 | 2.8 | 2.1 | 10.1 | 5.2 | 2.5 | 2.9 | 11.6 |
| Limonene | 10.6 | 2.6 | 7.3 | 15.4 | 17.1 | 5.0 | 6.9 | 21.9 | 13.9 | 4.4 | 6.5 | 20.6 |
| Terpinolene | 0.6 | 0.3 | 0.3 | 1.3 | 0.7 | 0.2 | 0.4 | 1.0 | 0.6 | 0.2 | 0.2 | 0.9 |
| α-Campholenal | 0.7 | 0.7 | 0.1 | 2.2 | 0.7 | 0.5 | 0.2 | 1.6 | 0.5 | 0.3 | 0.0 | 1.1 |
| *trans*-Pinocarveol | 0.4 | 0.4 | 0.0 | 1.2 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.7 | 0.3 | 0.2 | 0.0 | 0.6 |
| Bornyl acetate | 1.2 | 0.4 | 0.8 | 2.0 | 1.7 | 0.4 | 1.1 | 2.4 | 1.5 | 0.5 | 0.7 | 2.5 |
| α-Terpinyl acetate | 1.0 | 0.6 | 0.0 | 2.3 | 2.6 | 0.8 | 1.7 | 4.1 | 1.7 | 0.6 | 0.8 | 3.0 |
| α-Copaene | 0.2 | 0.2 | 0.0 | 0.8 | 0.5 | 0.3 | 0.1 | 1.1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.5 |
| Siberene | 0.3 | 0.3 | 0.0 | 1.3 | 0.7 | 0.5 | 0.1 | 1.7 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | 0.8 |
| *(E)*-β-Caryophyllene | 0.5 | 0.3 | 0.1 | 1.1 | 2.9 | 2.1 | 0.3 | 6.3 | 1.7 | 1.6 | 0.1 | 5.7 |
| α-Humulene | 0.3 | 0.4 | 0.0 | 1.6 | 0.7 | 0.6 | 0.0 | 1.7 | 0.5 | 0.5 | 0.0 | 1.9 |
| Germacrene D | 1.2 | 0.5 | 0.4 | 2.2 | 2.5 | 2.0 | 0.1 | 6.1 | 1.6 | 0.7 | 0.4 | 3.2 |
| γ-Cadinene | 0.6 | 0.4 | 0.1 | 1.3 | 1.0 | 1.1 | 0.0 | 3.4 | 1.0 | 0.6 | 0.2 | 2.0 |
| Caryophyllene oxide | 0.2 | 0.2 | 0.0 | 0.7 | 2.2 | 3.5 | 0.0 | 10.0 | 0.5 | 0.7 | 0.0 | 2.7 |
| *epi*-Cubenol | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.1 | 1.0 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.6 |

Main components of 40 samples: mean value (Mean), standard deviation (SD), minimum content (Min) and maximum content (Max).

unequal importance, the largest group being fractionated into two sub-groups. The present results complete harmoniously our previous results relative to the composition and chemical variability of leaf oil from Algerian *T. articulata*. Indeed, the compositions of cone oils varied substantially from those of aerial parts. It should also be mentioned the very good yields of cone oil (0.17-1.13%) compared with the yields obtained for aerial parts (0.03-0.86%) [6].

## Experimental

***Plant material:*** Forty samples of cones were collected from individual adult trees of *Tetraclinis articulata* in September 2014 at different altitudes in Tlemcen Province: Coastal township: Souk Tlata (samples ST1-ST5), Honaïne (samples H16-H20), Beni Khellad (samples BK31-BK35), Ghazaouet (samples G36-G40); highlands: Sabra (samples Sab6-Sab10); Aïn Kebira (samples AK11-AK15); Ouled Mimoun (samples OM21-OM25) and Sebdou (samples S26-S30). Identification of the species was performed by Pr M. Bouazza (Lab. Ecology and Management of Natural Ecosystems, Univ. Tlemcen, Algeria). A voucher specimen has been deposited at the Laboratory of Natural Products (Department of Biology, Univ. Tlemcen, Algeria), under the accession No. C. 46.

***Essential oil distillation:*** Crushed cones were submitted to hydrodistillation for 2.5 h using a Clevenger-type apparatus. Yields have been calculated from dry material.

***Analytical GC and $^{13}$C NMR analysis:*** GC and $^{13}$C NMR analyses were performed as previously reported [6].

***GC–MS analysis:*** The essential oils were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem equipped with a fused-silica capillary column (50 m x 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 µm), BP-1 (dimethylpolysiloxane). Carrier gas, helium at 0.8 mL/min; split, 1/60; injection volume, 0.5 µL; injector temperature, 250°C; oven temperature programmed from 60°C to 220°C at 2°C/min and then held isothermal (20 min); Ion source temperature, 250°C; energy ionization, 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 40-400 Da.

***Identification of components:*** Identification of the components was based: (i) on comparison of their GC retention indices (RI) on polar and apolar columns, determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software of Perkin-Elmer), with those of authentic compounds (ii) on computer matching with laboratory-made and commercial mass spectral libraries [13], and (iii) on comparison of the signals in the $^{13}$C NMR spectra of essential oils with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of laboratory-made software [12].

***Data analysis:*** Principal Components Analysis (PCA) and Hierarchical clustering (Ward's method) were performed by Xlstat (Adinsoft, France).

**Acknowledgments** - The authors gratefully acknowledge Pr. F. Lahfa (Dean, Faculty of Life Sciences, Tlemcen) for attribution of a travel grant and Pr. M. Bouazza (University of Tlemcen) for his help with the plant identification.

### References

[1] Quézel P, Santa S. (**1962**) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* Edition CNRS, Tome II, Paris, 34.

[2] Quézel P, Médail F. (**2003**) *Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Editions Technique et Documentation. Lavoisier, 125.

[3] Bellakhdar J, Honda G, Miki W. (**1982**) *Herb–Drugs and Herbalists in the Maghrib*. Institute of the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Tokyo.

[4] Ait Igri M, Holeman M, Ilidrissi A, Berrada M. (**1990**) Contribution to the chemical study of essential oils from the twigs and wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, ***24***, 36-43.

[5] Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhouchni M, Benjelloun W. (**1997**) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, ***58***, 45-54.

[6] Boussaïd M, Bekhechi C, Beddou F, Chabane Sari D, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. (**2015**) Chemical variability of the essential oil isolated from aerial parts of *Tetraclinis articulata* from North-Western Algeria. *Natural Product Communications*, ***10***, 1447-1452.

[7] Gherib M, Atik Bekkara F, Bekhechi C, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. (**2014**) Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Algerian *Warionia saharae* Benth. & Hook. *Journal of Essential Oil Research*, ***26***, 385-391.

[8] El-Haci IA, Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Mazari W, Gherib M, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. (**2014**) Antimicrobial activity of *Ammodaucus leucotrichus* fruit oil from Algerian Sahara. *Natural Product Communications*, ***9***, 711-712.

[9] Buhagiar J, Podesta MTC, Cioni PL, Flamini G, Morelli I. (**2000**) Essential oil composition of different parts of *Tetraclinis articulata*. *Journal of Essential Oil Research*, ***12***, 29-32.

[10] Tékaya-Karoui A, Ben Jannet H, Mighri Z. (**2007**) Essential oil composition of terminal branches, cones and roots of *Tetraclinis articulata* from Tunisia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, ***10***, 2495-2499.

[11] Chikhoune A, Hazzit M, Kerbouche L, Baaliouamer A, Aissat K. (**2013**) *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters essential oils: Chemical composition and biological activities. *Journal of Essential Oil Research*, ***25***, 300-307.

[12] (a) Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. (**1995**) Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analysis*, ***1***, 25-34; (b) Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. (**2002**) Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using $^{13}$C NMR spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*, ***56***, 312-317; (c) Ouattara ZA, Boti JB, Ahibo AC, Sutour S, Casanova J, Tomi F, Bighelli A. (**2014**) The key role of $^{13}$C NMR analysis in the identification of individual components of *Polyalthia longifolia* leaf oil. *Flavour and Fragrance Journal*, ***29***, 371-379.

[13] (a) US National Institute of Standards and Technology PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, Norwalk, CT (**1999**); (b) König WA, Hochmuth DH, Joulain D. (**2001**) Terpenoids and related constituents of essential oils, library of Massfinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg; (c) Adams RP. (**2007**) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.

**Structure of a Coumaric Acid Analogue with a Monoterpene Moiety from the Flowers of *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* and Evaluation of Cinnamic Acid Analogues as Nitric Oxide Production and Degranulation Inhibitors**
Seikou Nakamura, Jiang Liu, Souichi Nakashima, Keiko Ogawa, Takashi Ueda, Eri Onishi, Kiwako Kurooka, Yuko Moriwaki, Kaori Ryu, Bin Xu, Takahiro Matsumoto, Tomoe Ohta, Masashi Fukaya, Masayuki Yoshikawa and Hisashi Matsuda **1123**

**Identification of Cardioactive *Leonurus* and *Leonotis* Drugs by Quantitative HPLC Determination and HPTLC Detection of Phenolic Marker Constituents**
Kenny Kuchta, Jutta Ortwein, İhsan Çaliş, Rainer B. Volk and Hans W. Rauwald **1129**

**Macrocyclization Using RCM Reactions. Synthesis of Simple Metacyclophanes and Synthetic Efforts Toward Platycarynol, a 15-Membered Aromatic Ether**
Katsuyuki Nakashima, Hatsuna Matsunaga, Masako Ito, Hiroshi Minami, Akihito Aiba, Norihiro Fujisaki and Motoo Tori **1135**

**Secondary Metabolites from Fungal Endophytes of *Echinacea purpurea* Suppress Cytokine Secretion by Macrophage-Type Cells**
Amninder Kaur, Martina Oberhofer, Monika Juzumaite, Huzefa A. Raja, Travis V. Gulledge, Diana Kao, Stanley H. Faeth, Scott M. Laster, Nicholas H. Oberlies and Nadja B. Cech **1143**

**Two Novel Diphenolic Metabolites from the Inedible Mushroom *Thelephora palmata***
Ayako Nishio, Haruka Mikami, Hiroshi Imagawa, Toshihiro Hashimoto, Masami Tanaka, Takuya Ito, Miki Iguchi, Kanako Iseki, Masaaki Noji and Akemi Umeyama **1147**

**Virgin Coconut Oil and its Cardiovascular Health Benefits**
Zheng Feei Ma and Yeong Yeh Lee **1151**

**Influence of Thermal Processing and *in vitro* Digestion on the Antioxidant Potential of Ginger and Ginger Containing Products**
Wojciech Koch, Wirginia Kukula-Koch, Marcin Dziedzic, Kazimierz Głowniak and Yoshinori Asakawa **1153**

**Analysis of Carotenoids, Flavonoids and Essential Oil of *Calendula officinalis* Cultivars Growing in Estonia**
Ain Raal, Anne Orav, Julia Nesterovitsch and Kerttu Maidla **1157**

**Volatile Constituents of New Caledonian *Frullania* Species**
Benjamin Métoyer, Paul Coulerie, Nicolas Lebouvier, Edouard Hnawia, Louis Thouvenot, Yoshinori Asakawa, Phila Raharivelomanana and Mohammed Nour **1161**

**Characteristic Volatile Components of Trifoliate Orange Peel (*Poncirus trifoliata*)**
Kenichi Tomiyama, Kazutoshi Sakurai, Yoshihiro Yaguchi, Yukihiro Kawakami and Yoshinori Asakawa **1165**

**Composition and Chemical Variability of the Cone Oil from Algerian *Tetraclinis articulata***
Maghnia Boussaïd, Chahrazed Bekhechi, Fewzia Atik-Bekkara, Mathieu Paoli, Joseph Casanova and Félix Tomi **1167**

**Characteristic Aroma Features of Tencha and Sencha Green Tea Leaves Manufactured by Different Processes**
Toshio Hasegawa, Yuta Shimada, Hiroki Saito, Takashi Fujihara, Kenji Haraguchi, Atsushi Takahashi and Kenta Nakajima **1171**

**Enhancement of Pentobarbital-induced Sleep by the Vaporized Essential Oil of *Citrus keraji* var. *kabuchii* and its Characteristic Component, γ-Terpinene**
Yoshinori Kobayashi, Hiroaki Takemoto, Ziqi Fu, Emiko Shimizu and Yukitaka Kinjo **1175**

**Odor-Active Components of Luo Han Guo (*Siraitia grosvenorii*)**
Kenichi Tomiyama, Kazutoshi Sakurai, Yoshihiro Yaguchi and Yukihiro Kawakami **1179**

## *Accounts/Reviews*

**Research Progress on Natural Benzophenanthridine Alkaloids and their Pharmacological Functions: A Review**
Na Han, Zhiyou Yang, Zhihui Liu, Huijing Liu and Jun Yin **1181**

**Dinitrosyl Iron Complexes and other Physiological Metabolites of Nitric Oxide: Multifarious Role in Plants**
Konstantin B. Shumaev, Olga V. Kosmachevskaya, Ludmila V. Chumikina and Alexey F. Topunov **1189**

**Promising Anti-Hepatitis C Virus Compounds from Natural Resources**
Tutik Sri Wahyuni, Chie Aoki Utsubo and Hak Hotta **1193**

**Neural Transmission from Oropharyngeal Bitter Receptors to the Medulla is Partially or Completely Labelled-Line**
Michael K McMullen **1201**

# Natural Product Communications
# 2016

Volume 11, Number 8

## Contents

***Editorial***
Gerald Blunden and Pawan K. Agrawal *i*

***Preface***
Simon Gibbons *iii*

***Family Message***
Hisa Asakawa, Yoko and Tomomi Asakawa *iv*

***Original Paper***

**Chemical and Genetic Study of two *Ligularia* Hybrids in Shangrila County, Yunnan Province, China**
Ryo Hanai, Sayako Tanabe, Nao Aoyama, Yasuko Okamoto, Motoo Tori, Ningning Zhang, Xun Gong and Chiaki Kuroda **1057**

**A Puna Collection of *Senecio punae*, Main Source of a Versatile Eremophilane-type Ketone**
Ana María Rodríguez, Susana Montanaro, Alicia Bardón, Elena Cartagena and Susana Borkosky **1061**

**Capgermacrene C, a New Sesquiterpenoid from a Bornean Soft Coral, *Capnella* sp.**
Takahiro Ishii, Chin-Soon Phan, Takashi Kamada and Charles Santhanaraju Vairappan **1065**

**Cyclization into Hydrindanes Using Samarium Diiodide: Stereochemical Features Depending on the Protecting Group**
Masakazu Sono, Yukiko Nishibuchi, Norihito Yamaguchi and Motoo Tori **1067**

**A New *Seco*-Clerodane-Type Diterpenoid from Bornean Liverwort *Schistochila acuminata***
Shean-Yeaw Ng, Takashi Kamada, Monica Suleiman and Charles S. Vairappan **1071**

**Daphnane Diterpenoids from *Daphne altaica***
Alfarius Eko Nugroho, Wong Chin-Piow, Yusuke Hirasawa, Jenis Janar, Toshio Kaneda, Osamu Shirota and Hiroshi Morita **1073**

**16-Hydroxycembra-1,3,7,11-tetraene, a new Cembrane Diterpene from Malaysian Soft Coral Genus *Sarcophyton***
Takashi Kamada, Chin-Soon Phan, Hoe-Seng Tin, Charles Santhanaraju Vairappan and Tengku Sifzizul Tengku Muhammad **1077**

**A Novel 3,4-Secocycloartane Triterpene, Bearing a Tetrahydropyran Moiety, from *Pasania formosana* Leaf**
Shoei-Sheng Lee, Yue Xi, Chien-Kuang Chen, Ching-Chia Chang and Sheng-Fa Tsai **1079**

**Three Tetracyclic Triterpenoic Acids from *Dysoxylum densiflorum* and Their Antibacterial Activities**
Ni Komang T. Dharmayani, Lia D. Juliawaty and Yana M. Syah **1081**

**Six New Triterpenoids from the Aerial Parts of *Maytenus diversifolia***
Narumi Anoda, Mayumi Matsunaga, Miwa Kubo, Kenichi Harada and Yoshiyasu Fukuyama **1085**

**Optimization of 3', 4'-Anhydrovinblastine Synthesis *in vitro* Using Crude Extracts of *Catharanthus roseus* Irradiated with Near-Ultraviolet Light**
Mamiko Asano, Kazuo Harada, Akiko Umeno and Kazumasa Hirata **1089**

***De novo* Biosynthesis of Trigonelline in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seedlings**
Hiroshi Ashihara **1093**

**Glycosylation of Chrysin by Cultured Cells of** Eucalyptus perriniana
Kei Shimoda, Naoji Kubota, Masato Tanigawa and Hiroki Hamada **1097**

**Estrogenic and Anti-estrogenic Constituents of *Erythrina caffra***
Yu-Ming Hsu, Wan-Chun Lai, Chi-Ying Li, Yu-Hsuan Lan, Yu-Chi Tsai, Attila Hunyadi, Ming-Feng Hou, Shyng-Shiou Yuan, Yang-Chang Wu and Fang-Rong Chang **1099**

**A New Bioactive Secondary Metabolite from *Artocarpus elasticus***
Faiqah Ramli, Mawardi Rahmani, Intan Safinar Ismail, Mohd Aspollah Sukari, Mashitoh Abd Rahman, Asdren Zajmi, Abdah Md Akim, Najihah Mohd Hashim and Rusea Go **1103**

**Development of an Efficient Protocol for Cimifugin Isolation from *Peucedanum schottii* and Evaluation of Enzyme Inhibitory Activity**
Ewelina Kozioł, Ilkay Erdogan Orhan, F. Sezer Senol, Kalina Alipieva, Milen Georgiev and Krystyna Skalicka-Woźniak **1107**

**Pyranonigrin L, a New Antioxidant, Produced by the Hot Spring-derived Fungus *Penicillium adametzii* BF-0003**
Ryuji Uchida, Hidetoshi Miyazaki, Yuichi Yamaguchi, Hiroyuki Ishijima and Hiroshi Tomoda **1111**

**Lignans from the Whole Plants of *Hedyotis uncinella***
Yaping Pan, Yan Zhang, Chao Fan, Yu Zhang, Shikai Yan, Huizi Jin and Weidong Zhang **1115**

**Biological Activities of Isolated Compounds from Three Edible Malaysian Red Seaweeds, *Gracilaria changii*, *G. manilaensis* and *Gracilaria* sp.**
Yosie Andriani, Desy Fitrya Syamsumir, Tee Ching Yee, Faizah Shaharom Harisson, Gan Ming Herng, Siti Aishah Abdullah @ Christine Abellana Orosco, Abdul Manaf Ali, Jalifah Latip, Hiroe Kikuzaki and Habsah Mohamad **1117**

**Optical Resolution of (*RS*)-Denopamine to (*R*)-Denopamine β-D-Glucoside by Glucosyltransferase from *Phytolacca americana* Expressed in Recombinant** *Escherichia coli*
Hiroki Hamada, Shouta Okada, Kei Shimoda, Daisuke Uesugi and Hatsuyuki Hamada **1121**

*Continued inside backcover*

**الملخص:** بهدف تثمين النباتات الطبية في الجزائر،ركزنا اهتمامنا في هذه المذكرة ، أولا إلى تمييز التركيبة الكيميائية للزيوت العطرية للأجزاء الهوائية ولثمار نبتة *Tetraclinis articulata* Master (Thuya) (Vahl)(العرعار) التي تنمو تلقائيا في منطقة تلمسان، وذلك بواسطة التحليل الكروماتوغرافي الغازي CPG(Ir) و التحليل الكروماتوغرافي الغازي / قياس الطيف الكتلي (CPG-SM) ، بالإضافة إلى التحليل النووي المغناطيسي للكربون 13 (RMN du $^{13}$C)، ومن ناحية أخرى إلى دراسة القدرة البيولوجية لهذه الزيوت العطرية.

الجزء الأول يتعلق بدراسة الخواص الكيميائية للزيوت العطرية لنبتة *Tetraclinis articulata* و التي تم جمعها من ثماني محطات في منطقة تلمسان. مردودات الزيوت العطرية تختلف اختلافا كبيرا. الثمار(0,17 إلى 1,13٪)غنية جدا بالزيت العطري مقارنة بالأجزاء الهوائية (الأوراق والزهور) ، والتي تتراوح ما بين 0,03 إلى 0,86٪. التحليل المفصل للزيت العطري للأجزاء الهوائية عن طريق الجمع بين التقنيتين الكروماتوغرافية و الطيفية، كشف عن 35 مركبا كيميائيا. هذه الزيت غنية جدا بأحادي التربان من بينها α-بينين (23,6٪)،اسيتات البورنيل (20,7٪) والكافور (17,3٪) كمركبات رئيسية. ساعد التحليل الكيميائي ل 50 عينة من الزيت العطري للأجزاء الهوائية، جنبا إلى جنب مع تحليل البيانات الإحصائية (PCA، dendrogramme) إلى تسليط الضوء على التغير الكيميائي. وبالتالي، يتم تقسيم العينات إلى مجموعتين رئيسيتين (I و II ، والتي تنقسم بدورها إلى مجموعتين فرعيتين) وذلك وفقا لمحتوى الكافور (المجموعة I)، α-بينين (المجموعة الفرعية IIA) وα-بينين / اسيتات البورنيل (المجموعة الفرعية IIB). بالموازاة مع ذلك، قمنا بمتابعة التركيبة الكيميائية للزيوت العطرية للأوراق المحصل عليها من نفس القدم على مدار السنة. فأثبتنا أن مردود الزيت يختلف من شهر إلى آخر (0,16 إلى 0,66٪)، مع اكبر مردود كان في شهري جوان وديسمبر. التركيبة الكيميائية متجانسة نوعيا ولكن مختلفة كميا، ويتعلق هذا التباين بالمركبات الرئيسية: α-بينين (11,1-24,6٪)، اسيتات البورنيل (8,6 إلى 41,1٪) والكافور (2,2 إلى 16,4٪). لقد تابعنا بحثنا هذا أيضا بتحديد التركيبة الكيميائية للزيوت العطرية لثمار *Tetraclinis articulata* والتي تم جمعها من نفس محطات الأجزاء الهوائية. التحليل المفصل لست عينات من الزيوت العطرية للثمار كشف عن 38 مركبا والتي يهيمن عليها: α-بينين (73,6-47,1٪)، الليمونين (6,5- 21,9٪) وميرسين (تصل نسبته إلى 11,6٪). ساعد تحليل 40 عينة من الثمار، مع نتائج البيانات الإحصائية إلى تسليط الضوء على التغير الكيميائي. وبالتالي، تنقسم العينات إلى مجموعتين رئيسيتين تتميزان ب α-بينين (المجموعة I) والى مصاحبة α-بينين لليمونين (المجموعة II)IIB..

وخصص الجزء الثاني لدراسة فعالية هذه الزيوت كمضادات للميكروبات و للأكسدة. الزيوت العطرية ل*Tetraclinis articulata* والتي تتميزبثلاث تراكيب كيميائية مختلفة (α-بينين، كافور، اسيتات البورنيل)، أظهرت نشاط جد فعال في محاربة صنفي البكتيريا العنقودية *Staphylococcus aureus* والفطر *Aspergillus fumigatus* *مع أقطار تثبيط تراوح قطرها ما بين*20 و 38,5 ملم. لقد اثبت أن الزيت العطري الغني بمركب الكافور هو الأكثر فعالية مع قيم التركيز الأدنى للتثبيط (CMIs) متراوحة ما بين 1و3 ميكرولتر/ملل، بينما الزيت الغني بـα-بينين تبين أنه الأقل نشاطا مع قيم CMIs متراوحة مابين 2 و6 ميكرولتر/ملل ضد نفس الميكروبات. ثم قمنا في الأخير بدراسة النشاط المضاد للأكسدة باستخدام ثلاث طرق:تثبيط الجدر الحرDPPH،تثبيط تلون البيتاكاروتين،وارجاع الحديد للزيوت العطرية الثلاثة للأجزاء الهوائية ولاثني عشر عينة من الثمار مختارة تتميز بثلاثة أنواع كيميائية مختلفة (حسب النسب المئوية لـα-بينين والليمونين). وأظهرت النتائج وجود قوة مضادة للأكسدة منخفضة لجميع الزيوت الأساسية مقارنة مع المركبات المرجعية.

**الكلمات المفتاحية :** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters، الزيت العطري، CPG(Ir)، CPG-SM و RMN ل $^{13}$C، القدرة المضادة للميكروبات، التركيز الأدنى المثبط، القدرة المضادة للأكسدة.

---

**Résumé :** Dans le but de valoriser les plantes médicinales algériennes, nous sommes intéressés dans ce mémoire d'une part, à la caractérisation chimique par CPG (Ir), CPG-SM et RMN du $^{13}$C des huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes et des cônes de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Thuya), poussant spontanément dans la région de Tlemcen, et d'autre part, à la détermination des activités biologiques de ces huiles essentielles.

La première partie concerne la caractérisation chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* prélevées dans huit stations de la région de Tlemcen. Les teneurs en huile essentielle sont très variables. Les cônes (0,17-1,13%) sont plus riches en huiles essentielles que les parties aériennes (feuilles et fleurs), de 0,03 à 0,86%. L'analyse détaillée de l'huile essentielle des parties aériennes, par combinaison des techniques chromatographiques et spectroscopiques, a permis d'identifier 35 composés. Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes ; l'α-pinène (23,6%), l'acétate de bornyle (20,7%) et le camphre (17,3%) étant les composés majoritaires. L'analyse de 50 échantillons d'huile essentielle des parties aériennes, associée à un traitement statistique des données (PCA, dendrogramme) a permis de mettre en évidence une variabilité chimique. Ainsi, les échantillons se répartissent en deux principaux groupes (I et II lui-même subdivisé en deux sous-groupes) selon les teneurs en camphre (groupe I), en α-pinène (sous-groupe IIA) et en α-pinène/acétate de bornyle (sous-groupe IIB). En parallèle, nous avons suivi la composition chimique des huiles essentielles des feuilles récoltées sur un même pied au cours d'une année et constaté que les rendements en huile essentielle varient d'un mois à un autre (0,16 à 0,66%) avec les valeurs les plus importantes observées pour les mois de juin et de décembre. La composition demeure qualitativement homogène mais présente des différences quantitatives. Cette variabilité concerne les composés majoritaires, à savoir : α-pinène (11,1-24,6%), acétate de bornyle (8,6-41,1%) et camphre (2,2-16,4%). Nous avons poursuivi nos travaux par la détermination de la composition chimique des huiles essentielles des cônes de *Tetraclinis articulata* prélevés dans les mêmes stations. L'analyse détaillée de six échantillons d'huile essentielle de cônes a permis d'identifier 38 composés, dont la composition chimique est dominée par l'α-pinène (47,1-73,6%), le limonène (6,5-21,9%) et le myrcène (jusqu'à 11,6%). L'analyse de 40 échantillons de cônes, avec la combinaison des résultats statistiques a permis de mettre en évidence une variabilité chimique. Ainsi, les échantillons se répartissent en deux principaux groupes caractérisés par l'α-pinène (groupe I) et l'association α-pinène/limonène (groupe II).

La deuxième partie a été consacrée à l'étude de l'activité antimicrobienne et antioxydante de ces huiles essentielles. Les huiles essentielles des parties aériennes de *Tetraclinis articulata* présentant trois compositions chimiques différentes (α-pinène ou camphre ou acétate de bornyle majoritaire), agissent de façon très active contre les deux souches de *Staphylococcus aureus* et contre *Aspergillus fumigatus*, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 20 et 38,5 mm. L'huile essentielle à camphre majoritaire s'est avérée la plus intéressante, avec des CMIs variant entre 1 et 3 µL/mL tandis que celle à α-pinène présente la moins bonne efficacité avec des CMIs variant entre 2 et 6 µL/mL, vis-à-vis des mêmes micro-organismes. Enfin, nous avons testé l'activité antioxydante avec trois méthodes : DPPH, *β*-carotène et FRAP, vis-à-vis de trois échantillons d'huile essentielle des parties aériennes et de douze échantillons de cônes présentant trois compositions chimiques différentes, en fonction des pourcentages d'α-pinène et de limonène. Les résultats obtenus ont révélé une faible activité antioxydante pour l'ensemble des huiles essentielles par comparaison aux composés de référence.

**Mots clés :** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, huile essentielle, CPG (Ir), CPG-SM et RMN du $^{13}$C, activité antimicrobienne, CMI, activité antioxydante.

---

**Abstract:** In order to promote Algerian medicinal plants, we were interested in this work by the chemical characterization by CG (Ir), CG-SM and $^{13}$C NMR of the essential oils obtained from the aerial parts as well as the cone of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Barbary Thuya), growing in a spontaneous state in the region of Tlemcen on one hand, and the determination of the biological activities of these essential oils on the other hand.

The first part concerned the chemical characterization of the essential oil of *Tetraclinis articulata* brought to Tlemcen in eight stations. The essential oil yields are very variable. The cone (0.17-1.13%) are rich in essential oils than the aerial parts (leaves and flowers), from 0.03 to 0.86%. A detailed analysis of aerial parts essential oil, using the combination of chromatographic and spectroscopic techniques, leads to the identification of 35 compounds. This essential oil is rich in monoterpens which α-pinene (23.6%), bornyl acetate (20.7%) and the camphor (17.3%) being the main constituents. The analysis of 50 samples of aerial parts essential oil, associated with statistical treatment of the results (PCA and Dendrogram), suggested the occurrence of a chemical variability. Samples are divided into two groups (I and II which is subdivided in two sub-groups) based on their contents in camphor (groupe I), in α-pinene (sub-groups IIA) and in association α-pinene/bornyl acetate (sub-groups IIB). In parallel, we followed the chemical composition of leaves essential oils collected on the same foot during one year and noted that the essential oil yields varied from one month to another, ranging between (0.16 à 0.66%) with the most important values observed for December and June. The composition remains qualitatively homogeneous but present quantitative differences. This variability also concerned to major compounds, namely: α-pinene (11.1-24.6%), bornyl acetate (8.6-411%) and camphor (2.2-16.4%). We continued our work by the determination of the chemical composition of the cone essential oils of *Tetraclinis articulata* isolated from the same stations. A detailed analysis of six samples of the cone's essential oil leads to the identification of 38 compounds, of which the chemical composition are dominated by the α-pinene (47.1-73.6%), limonene (6.5-21.9%) and myrcene (up to 11.6%). The analysis of 40 samples of the cone's essential oil, associated with statistical treatment, suggested the occurrence of a chemical variability. Thus, samples are divided into two independent groups characterized by α-pinene (group I) and association α-pinene/limonene (group II).

The second part concerned the study of the antimicrobial and antioxidant activity of these essential oils. Essential oils of the aerial parts of *Tetraclinis articulata* presenting three different chemical compositions (α-pinene, or camphor or bornyl acetate majority), displayed the highest activity against both *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus fumigatus*, with diameters of the zones of inhibition ranging between 20 and 38.5 mm. However, essential oil with camphor as major component was the most interesting, with CMIs ranging between 1 and 3 µL/mL. While, essential oil with α-pinene remains the less effective, with CMIs ranging between 2 and 6 µL/mL, against to the same micro-organisms. Finally, we tested the antioxidant activity with three methods: DPPH, β-carotene and FRAP, with respect to three samples of essential oil of the aerial parts and twelve of cones exhibiting three different chemical compositions, according to the percentages of α-pinene and limonene. The results obtained revealed a weak antioxidant capacity for the whole essential oils by comparison with the reference compounds.

**Keywords:** *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, essential oil, GC (Ir), GC-MS, and $^{13}$C NMR, antimicrobial capacity, MIC, antioxidant capacity.