

Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord Est Algérien

Chemical composition and antibacterial activity of the needles essential oil of *Pinus halepensis* Mill. from North East of Algeria

Nina Sadou^{1*}, Ratiba Seridi¹, Abdelghani Djahoudi² & Youcef Hadeif³

¹Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, Faculté des Sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000, Annaba, Algérie.-

²Laboratoire de Microbiologie. Faculté de Médecine Université Badji Mokhtar BP12, 23000, Annaba, Algérie.

³Laboratoire Chimie Analytique, Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar- Annaba BP12, 23000, Annaba, Algérie.-

Soumis le : 03.07.2013

Révisé le : 22.11.2014

Accepté le : 07.01.2015

الزيوت الطيارة للأوراق الابرية لنبته الصنوبر الحلبي *Pinus halepensis* Mill. التي قطفت من منطقة بحيرة الملاح في الحظيرة الوطنية للقاله و من غابة الزعرورية بولاية سوق أهراس تم الحصول عليها عن طريق التقطير حيث أعطت المردود 0,81% , 0,3% على التوالي. الزيت الطيار للصنوبر الحلبي التابع لبحيرة الملاح مكون من 16 مركبا بنسب أغلبية ل : β -caryophyllène (31,89%), α -pinène (24,41%), β -myrcène (19,38%). أما بالنسبة للزيت الطيار الخاص بصنوبر الزعرورية فعدد مركباته 16 ومثله خاصة بواسطة α -pinène (21,01%), caryophyllène (31,14%), β -terpinolène (9,43%). جربت تلك الزيوت الطيارة مخبريا على ثلاثة أنواع من البكتيريا (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) المقاومة للمضادات الحيوية والمسؤولة غالبا على الالتهابات, فكتشفت نشاط ضد هذه الأنواع من البكتيريا.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الطيارة - *Pinus halepensis* Mill.- CG/SM - نشاط ضد البكتيريا

Résumé

L'huile essentielle d'aiguilles de *Pinus halepensis* Mill., récoltées dans la forêt du lac Mellah situé dans le Parc National d'El Kala et la forêt Zaarouria (Souk Ahras), obtenue par hydrodistillation donne respectivement un rendement de 0,81% et de 0,3%. L'huile essentielle des aiguilles du lac Mellah comprend 16 constituants. Les majoritaires sont, le β -caryophyllène (31,89%), l' α -pinène (24,41%) et le β -myrcène (19,38%). Celle de Zaarouria, comprend 16 composés représentés essentiellement par l' α -pinène (21,01%), le β -caryophyllène (31,14%) et l' α -terpinolène (9,43%). Ces huiles essentielles testées *in vitro* sur trois souches antibio-résistantes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli*), souvent responsables d'infection nosocomiale ont montré un pouvoir antibactérien.

Mots clés : huile essentielle - *Pinus halepensis* Mill. - activité antibactérienne - CG/SM.

Abstract

The needles essential oils of *Pinus halepensis* Mill. collected from the Mellah Lake forest located in the National Park of El Kala and from the forest of Zaarouria forest (Souk Ahras), obtained by hydrodistillation. Give a yield of 0,81% and 0,3% respectively. The essential oils of the needles from Melah lake is composed from 16 compounds, which three in majority are: β -caryophyllene (31,89%), the α -pinene (24,41%) and the myrcene (19,38%). But those of Zaarouria forest from the 16 identified compounds are the α -pinene (21,01%), the β -caryophyllene (31,14 %) and the α -terpinolene (9,43 %). These essential oils were tested *in vitro* against three antibiotic resistant bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) often responsible for nosocomial infections have showed antibacterial activity.

Keywords: essential oils - *Pinus halepensis* Mill. - Antibacterial activity - GC/MS.

*Auteur correspondant : bionina2001@yahoo.fr

1. INTRODUCTION

Les plantes médicinales constituent une composante fondamentale pour l'avenir du système de santé dans le monde; elles demeurent une source inépuisable de substances biologiquement actives. La phytothérapie est une discipline qui tend toujours à se renouveler, car la recherche des nouveaux médicaments est continuelle [1].

Les limites de l'antibiothérapie, vis-à-vis des bactéries multi-résistantes nous incitent à chercher de nouvelles possibilités, pour lutter contre celles-ci. L'essor actuel de la thérapie par des substances d'origine végétale telles que les huiles essentielles offre de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, depuis quelques années, un intérêt accru est porté sur les huiles essentielles ayant montré des propriétés antibactériennes [2]. Les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable connue depuis l'Antiquité, elles sont utilisées dans de nombreux domaines, pharmaceutique, cosmétique-et agro-alimentaire [3]. *Pinus halepensis* Mill., ou pin d'Alep est un arbre de 15 à 20 m de haut, aux branches étalées qui occupe une aire de répartition morcelée sur tout le pourtour méditerranéen. Son écorce lisse de couleur gris-argentée, devient crevassée gris-brunâtre, riche en tanins. Les aiguilles sont de fausses feuilles persistantes, filiformes, groupées par paire. Les cônes femelles ovoïdes de 6 à 12 cm de long, sont d'un roux vif, luisant à maturité [4, 5, 6].

En Algérie, *P. halepensis* Mill., occupe principalement l'étage semi-aride et s'accommode bien aux terrains calcaires. Cette espèce forme des forêts dans les collines et les régions sèches du littoral méditerranéen ainsi que dans les montagnes semi-arides; elle peut atteindre parfois jusqu'à 2 200 m d'altitude dans les montagnes sèches de l'intérieur, et dans les terrains calcaires du littoral algérien [7, 8].

Le pin a des vertus thérapeutiques connues depuis longtemps ; en Algérie, ses bourgeons, ses aiguilles, son essence et sa résine sont utilisés en médecine traditionnelle comme expectorant, balsamique, antiseptique et antirhumatismal [9, 10, 11]. L'objectif de ce travail est la caractérisation de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* Mill., et l'étude de son activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches bactériennes résistantes aux

Antibiotiques, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Les aiguilles de *P. halepensis* Mill. ont été récoltées au printemps dans deux sites ; la forêt du lac Mellah dans le Parc National d'El Kala, caractérisée par un climat humide et la forêt Zaarouria à Souk Ahras caractérisée par un climat subaride.

Nous avons prélevé au hasard, des aiguilles portées par des rameaux inférieurs d'environ dix arbres en floraison dans chacun des deux sites. L'espèce a été identifiée selon la flore de Quezel et Santa ainsi que celle de Maire [7, 8]. La récolte a été réalisée tôt le matin car les vertus thérapeutiques des plantes y sont le plus concentrées. Les aiguilles ont été nettoyées puis séchées dans un endroit sec, aéré et à l'abri de la lumière [12].

2.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée par entraînement à la vapeur d'eau à l'aide d'un appareil de type Clevenger [13, 14]. Un échantillon de 100 g d'aiguilles sèches est soumis à ébullition pendant trois heures dans de l'eau distillée, l'extrait obtenu est passé à travers du sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer les traces d'eau. L'huile essentielle est stockée à 4°C dans des flacons en verre ambré, pour une analyse chimique ultérieure [15, 16]. Le rendement en huile essentielle est exprimé par le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale utilisée [17].

2.3. Détermination de la composition chimique

La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Shimadzu QP2010, les analyses ont été réalisées en mode ionisation par impact électronique (EI) avec une énergie d'ionisation de 70 eV en utilisant l'acquisition en mode SCAN. La colonne utilisée est une OV 17 de 25 m x 0,25 mm x

0,25 µm. Les injections ont été faites en mode splitless. L'hélium a été employé comme gaz vecteur à un débit de 1 mL.min⁻¹. La température de la colonne est de 60 à 220°C à raison de 3°C min⁻¹ en mode splitless. Les températures de l'injecteur et de la ligne de

transfert sont de 250 et 220°C. La température du four a été programmée comme suit : la température initiale de la colonne est de 60°C maintenue en isotherme pendant 4 min puis augmentée à raison de 3°C.min⁻¹ pour atteindre 220°C. Le volume injecté de l'huile essentielle diluée à 10% dans l'hexane est de 0,1 µL. Les composés de cette huile correspondants aux pics majeurs de chaque chromatogramme ont été identifiés, d'une part, par comparaison de leurs temps de rétention (Tr) avec ceux d'une série témoins d'alcane linéaires (C₉-C₂₈), et d'autre part, par comparaison de leurs spectres de masses avec ceux des composés chimiques répertoriés dans une banque de données Nist27 [18, 19].

2.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le test de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou aromagramme [20]. L'aromagramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme, il permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'huile essentielle par mesure du diamètre d'inhibition, autour d'un disque imprégné de celle-ci, ou d'un produit à base d'huile essentielle [21]. Trois concentrations d'huile essentielle ont été testées, l'extrait naturel brut ainsi que deux dilutions au un-demi et au un-quart de celui-ci. Ces huiles ont été diluées dans le DMSO (Diméthyle sulfoxyde). Trois souches bactériennes cliniques isolées ont été choisies pour leur résistance aux antibiotiques, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, ce sont des bactéries Gram(+) et Gram(-) pathogènes pour l'homme. Un disque de 6 mm de diamètre en papier Whatman stérile est imprégné de l'huile essentielle d'aiguilles de *P. halepensis* Mill. puis déposé au milieu d'une boîte de Petri de 90 mm de diamètre contenant un milieu gélosé « Mueller Hinton » de 4 mm d'épaisseur, préalablement ensemencé par écouvillonnage avec l'inoculum. Ce dernier est préparé à une concentration de 0,5 Marc Ferland, de 10⁶ à 10⁸ CFU.mL⁻¹ pour chaque souche. Un disque imprégné avec le DMSO (Diméthyle sulfoxyde) est appliqué dans les boîtes témoins, trois répétitions sont réalisées pour chaque essai. Les boîtes de Petri sont incubées pendant 24 h à 37°C, la lecture s'effectue par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, qui se traduit par un halo translucide autour de chaque

disque; la présence ou l'absence d'un halo expliquerait la sensibilité ou la résistance des germes vis-à-vis des extraits testés; selon une échelle de notation symbolique allant de - à +++ et dont la lecture d'après [22, 23] se fait comme suit :

Ø < 10 mm : huile essentielle (HE) sans action inhibitrice (-)

16 > Ø ≥ 10 mm : HE à une action inhibitrice intermédiaire (+)

25 > Ø ≥ 16 mm : HE à une action inhibitrice importante (++)

Ø ≥ 25 mm : HE à une action inhibitrice très efficace (+++)

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement

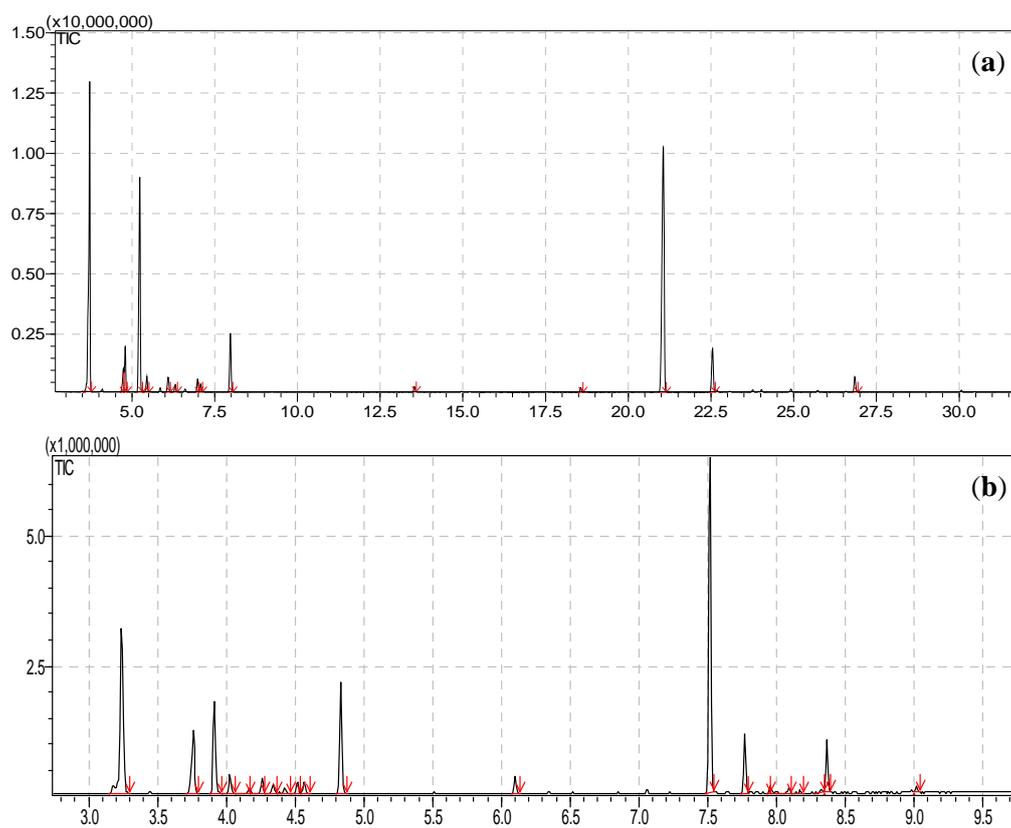
Le rendement moyen (0,81%) de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. récoltées dans le site 1 est supérieur à celui (0,3%) du site 2. Nous notons que le rendement de l'huile essentielle de la même espèce récoltée dans la région de Sidi Fredj en Algérie, est de 0,52% [24]. Cette variation est probablement due à la sensibilité de l'huile essentielle aux facteurs biotique et abiotique.

3.2. Composition chimique

Les chromatogrammes de l'huile essentielle obtenus sont comparés à la banque de donnée NIST27, afin d'identifier les composés correspondants, d'où l'intérêt de la CG/SM. Les constituants chimiques identifiés dans les aiguilles de pin du lac Mellah (site1) sont au nombre de 16 (Tab.1 et fig.1a), ce sont principalement le β-caryophyllène (31,89%), l'α-pinène (24,41%) et le β-myrcène (19,38%). Les composés mineurs sont représentés par l'α-terpinolène (5,27%), l'α-caryophyllène (4,76%), la Sabinène (3,42 %) et le β-pinène (2,13%). L'analyse chromatographique de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. du site 2 a décelé la présence de 16 composés (Tab.1 et Fig.1b), parmi lesquels on distingue des constituants majoritaires tels que: l'α-pinène (21,01%) et le β-caryophyllène (31,14%), ces deux composés constituent plus de la moitié de la composition totale de cette huile. Cependant, d'autres constituants présents en quantités moins importantes ont été identifiés, à savoir le β-myrcène (9,3%), la sabinène (8,21%), l'α-terpinolène (9,43%) et le phényl-éthyl-isovalérate (3,9%).

Tableau.1 : Composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.

Tr (min)	Composé	Aire de présence (%)	
		Site 1	Site 2
3.18	α -thugène	-	0.63
3.72	α -pinène	24,41	21,01
4.74	β -pinène	2.13	-
4.79	Sabinène	3.42	8.21
5.24	β -myrcène	19.38	9.3
5.45	β -carène	1.33	2.17
4.17	α -terpinène	-	0.56
5.85	Terpinène 4-acétate	0,40	-
6.09	Limonène	1.35	1.59
6.31	α -phelandrène	0.66	0.94
6.78	β -cis-ocimène	1.13	1.18
7.07	γ -terpinène	6.69	1.02
7.97	α -terpinolène	5.27	9.43
13.53	Terpinène 4-ol	0.56	1.28
18.56	α -cubibène	0.46	0.59
21.06	β -caryophyllène	31.89	31.14
22.55	α -caryophyllène	4.76	4.68
26.84	Phényl-éthyl-isovalerate	1.61	3.9
Nombre total de composés identifiés		16	16
Aire de présence totale		99.43%	97.63%

Figure.1 : Chromatogrammes de l'huile essentielle de *P. halepensis* des sites 1 (a) et 2 (b).

Les résultats obtenus montrent qu'il existe des différences qualitative et quantitative dans la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Des deux sites. Cette variation serait due principalement aux facteurs de l'environnement qui exercent une influence directe sur la composition et la production de cette huile.

Les investigations réalisées en Algérie sur la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. Ont montré qu'il existe plusieurs chémotypes pour cette même espèce. Les régions de Djelfa et Tissemsilt, sont caractérisées par le chémotype α -pinène (17,56%) et β -myrcène (8,45%) [25], Sidi Fredj est représenté par le β -caryophyllène [24] et enfin, le chémotype de l'HE de la région de Ghazaouet est le caryophyllène oxyde avec un taux de 48% [26].

La composition chimique de l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill. En provenance du Maroc est de chémotype α -pinène (23,2%) et 4-ol caryophyllène (14,24%) [13]. L'analyse menée par Roussis et al. [27] sur la même espèce de Grèce, montre que la composition est dominée par l' α -pinène (13,4%); et le caryophyllène (19,05%), alors que celle de Tunisie est à dominance β -caryophyllène (33,9%) et β -pinène (10,76%) [28]. Macchioni et al. [29] rapportent que les constituants majoritaires des aiguilles de pin d'Alep d'Italie sont, le myrcène (27,9%) et l' α -pinène (18,1%).

Les monoterpènes hydrocarbonés représentent un pourcentage élevé dans la composition chimique de l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep des sites 1 et 2, ces taux sont respectivement de 59,07% et 57,58%. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont de 37,07% dans le site 1 et 37,16% dans le site 2. Les monoterpènes oxygénés ne sont présents que dans l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Du site 1 avec un taux de 0,56%.

La présence d'autres composés chimiques dans l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Provenant des sites 1 et 2 représente respectivement une aire de 2,93% et 4,04%.

Nos résultats corroborent avec ceux de Dob et al. [24] et Hamamouchi et al. [13], ils mentionnent une prédominance des monoterpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés dans l'HE des aiguilles de *P. halepensis* Mill.

3.3. Activité antibactérienne

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne, des huiles essentielles testées,

est effectuée par la méthode de disques. La mesure en millimètres, du diamètre des zones d'inhibition des cultures, permet d'évaluer l'efficacité ou non de l'huile essentielle sur les germes testés. D'une manière générale, les huiles essentielles testées ont exercé une activité antibactérienne plus accrue que celle enregistrée en présence des antibiotiques testés.

A travers nos résultats (Tab. 2), l'huile essentielle brute des aiguilles de pin du lac Mellah a montré un effet inhibiteur contre les souches testées, cet effet est similaire à celui provoqué par l'HE des aiguilles provenant de Zaarouria. La souche *S. aureus*, Gram (+), est plus sensible qu'*E. coli* et *P. aeruginosa*, Gram (-), sous l'action des extraits testés. Plusieurs travaux [19, 30, 31, 32] ont rapporté que les bactéries Gram (+) sont plus susceptibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram(-).

La résistance élevée des bactéries Gram (-) est attribuée à la présence d'une membrane externe, imperméable aux composés hydrophobes grâce à son revêtement lipopolysaccharide. L'absence de cette barrière, chez les bactéries Gram (+) permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique [30, 31, 32, 33]. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Abi Ayad et al. [26], qui ont observé une sensibilité plus importante chez *S. aureus* que chez *E. coli* et *P. aeruginosa* vis-à-vis des HE de *Pinus halepensis* Mill.

Les propriétés antibactériennes des HE de plusieurs plantes aromatiques et médicinales sont attribuées à leur composition chimique et surtout aux alcools terpéniques. En outre, le fort pouvoir inhibiteur des HE est du essentiellement à ses principaux constituants [33]. De même, l'activité des HE testées est probablement due aux composés majoritaires (caryophyllène et pinène); en effet, une étude indique que la présence de caryophyllène dans l'HE de *Bidens pilosa* joue un rôle important dans l'activité antibactérienne. En outre, des essais affirment l'efficacité des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés sur *E. coli*; ils sont capables de détruire l'intégrité cellulaire, en inhibant la chaîne respiratoire et le processus de transport d'ions [34]. D'autres tests de l'activité antibactérienne ont montré que le terpinène 4-ol exerce une activité bactériostatique vis-à-vis de

plusieurs microorganismes [19]. Par ailleurs plusieurs investigations ont confirmé que la présence du terpinène 4-ol, à faible concentration dans une HE, est responsable de son activité vis-à-vis de *S. aureus* [35].

P. aeruginosa qui est une bactérie Gram (-) a montré une résistance vis-à-vis de l'HEz par contre l'HEm a manifesté des caractéristiques bactériostatiques très intéressantes. La résistance de *P. aeruginosa* a été signalée dans plusieurs recherches [30], en plus cette bactérie a une capacité à former un biofilm, une

organisation complexe composée de différentes couches, dans laquelle les bactéries se trouvent dans des conditions physiologiques spécifiques à leur situation [34].

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de nos HE peut aussi, être attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatiles ; les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires. Ceci est confirmé par plusieurs études [13, 32, 33].

Tableau.2 : Activité inhibitrice de l'huile essentielle des aiguilles de *P. halepensis* Mill. Et anti biotype pour les trois souches bactériennes.

Souches	HEm	HEm'	HEm''	HEz	HEz'	HEz''	antibiotiques		
							PIP	CAZ	OX
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	-	+	nd	nd	R
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-	-	-	S	R	nd
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	-	R	R	nd

HE: huile essentielle brute; HE': HE diluée à ½ (v/v); HE'': HE diluée à ¼ (v/v); CAZ: ceftazidime ; PIP :piperacilline OX :oxacilline ; R :résistante ;S :sensible , HE diluée à ¼ (v/v); m: lac Mellah; z: Zaarouria ; nd : non déterminée.

4. CONCLUSION

Le rendement de l'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du lac Melah (site 1) est plus élevé que celui de Zaarouria (site 2). Notre étude sur la composition chimique de cette huile a permis de faire ressortir un chémotype d'huile essentielle β -caryophyllène, commun aux deux sites, les forêts de lac Melah et de Zaarouria. L'huile essentielle des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. testée a été plus active vis-à-vis des bactéries Gram (+), *Staphylococcus aureus*, que sur les bactéries Gram (-), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

REFERENCES

- [1] Duraffourd C., Lapraz J-C. et Chemli R., 1997. La plante médicinale de la tradition à la science. Ed. Grancher. Paris. 538p.
- [2] Kempf M., Eveillard M., Kowalczyk F., Rossines E., Panhelleux G. et Joly-Guillou M.L., 2011. Étude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies, Pathologie Biologie, Vol. 59(1), 39-43.
- [3] Kaloustrian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L. et Vergnes M-F., 2008. Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne, *Phytothérapie*, Vol. 06,160-164.

- [4] Nahal I., 1985. Taxonomie et aire géographique des pins du groupe *halepensis*. *CIHEAM*, Paris, Vol. 86(1), 11-23.
- [5] Coombes A.J., 1993. Les Arbres. Ed. BORDAS. Paris. 320-335.
- [6] Quezel P. et Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris. 31-40.
- [7] Maire R., 1952. Flore de l'Afrique du Nord. Ed. Encyclopédie Biologique. Paris. 129-150.
- [8] Bezanger L., Pinkas M. et Torck M., 1986. Les plantes dans la thérapeutique moderne. Ed. Maloine. Paris. 11-18.
- [9] Leclerc H., 1994. Précis de phytothérapie. Ed. Masson. Paris. 257p.
- [10] Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. Ed. TEC et DOC. Paris. 484-574.
- [11] Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. Ibis Press. 759p.
- [12] Cecchini T., 2003. Encyclopédie des Plantes médicinales. Ed. De Vecchi S.A. Paris. 351p.
- [13] Hmamouchi M., Hamamouchi J., Zouhdi M. et Bessiere J.M., 2001. Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. *Essential Oil Research*, Vol13, 298-302.
- [14] Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissio M., Sökmenc A. et Akpulat H. A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.

(Asteraceae), *Ethnopharmacology*, Vol.87, 215-220.

[15] Loizzo M.R., Tundis R., Conforti F., Saab A.M., Statti A.G. et Menichini F., 2007. Comparative chemical composition, antioxidant and hypoglycemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* L. berry and wood oils from Lebanon, *Food Chemistry*, Vol. 105, 572-578.

[16] Tsitsimpikou C., Petrakis P.V., Ortiz A., Harvala C. et Roussis V., 2001. Volatile needle terpenoids of six *Pinus* species, *Essential Oil Research*, Vol. 13, 174-178.

[18] Benyoucef E., Yahyaoui N., Khelfaoui A. et Aid F., 2005. Water distillation Kinetic study of spearmint essential oil and of its major components, *Flavors and Fragrance*, Vol. 20, 30-33.

[18] Adams R.P., 2001. Identification of Essential Oils components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured. Ed. Carol Stream. USA. 454p.

[19] Xianfei X., Xiaoqiang C. et Shunying Z.G., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China, *Food Chemistry*, Vol. 100, 1312-1315.

[20] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Sixth Ed. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA.

[21] Vincent M.C., 1991. L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie. 4, Paris 6.

[22] Meena M.R. et Sethi V., 1994. Antimicrobial activity of the essential oils from spices, *Food Science and Technology*, Vol. 31, 68-70.

[23] Jeovetz L., Buchbauer G., Stoyanova A. et Metodiev S., 2000. Seasonal depending variations of the composition and biological activities of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) essential oils from Bulgaria, *Scientia Pharmaceutica*, Vol. 66, 323-328.

[24] Dob T., Berramdane T. et Chelgoum C., 2005. Chemical Composition of essential oil of *Pinus halepensis* Miller growing in Algeria, *Comptes Rendus Chimie*, Vol. 8, 1935-1945.

[25] Tazerouti F., Badjah-Hadj-Ahmed A.Y., Meklati B.Y., Favre-Bonvin J. et Bobenrieth M.J., 1993. Analyse des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. par CG/SM, *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, Vol. 26(3), 161-176.

[26] Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A., Rebiahi S.A., Ziani Cherif C. et Bessiere J.M., 2011. Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil, *Medicinal Plants Research*, Vol. 5(22), 5433-5436.

[27] Roussis V., Petrakis P.V., Ortiz A. et Mazomenos E.B., 1995. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece, *Phytochemistry*, Vol. 39(2), 357-361.

[28] Amri I., Hamrouni L., Hanana M., Gargouri S., Fezzan T., et Jamoussi B., 2013. Biological Agriculture et Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems.

[29] Macchioni F., Cioni P.L., Flamini G., Morelli I., Maccioni S., et Ansaldi M., 2003. Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy, *Flavors and Fragrance*, Vol. 18, 139-143.

[30] Sandri I.G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L. et Echeverrigaray S., 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria, *Food Chemistry*, Vol. 103, 823-828.

[31] Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub A. et Gharsallah N., 2011. The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia, *Lipids in Health and Disease*, Vol.10, 161.

[32] Al-Bayati A.F., 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts, *Ethnopharmacology*, Vol. 116, 403-406.

[33] Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H.S., Raherimandimby M. et Danthu P., 2009. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*, *Food Chemistry*, Vol. 114, 680-684.

[34] Abi-ayad M., Abi-ayad F.Z., Lazzouni H.A. et Rebiahi S.A. 2011. Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen), *Natural Product Research*, Vol.1(1), 33-36.

[35] Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. et Tawata S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiatauda*, *Food Control*, Vol. 19, 346-352.