

## Article de recherche

Reçu: 07 février 2023 /Accepté: 25 juillet 2023

# Etude comparative de la composition de l'huile essentielle du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) obtenue par trois techniques d'extractions (macération, soxhlet et distillation)

S. Moutchou<sup>1\*</sup>, Y. Badjah-Hadj-Ahmed<sup>2</sup>, M. Khemici<sup>1</sup>,  
H. Himrane<sup>1</sup>, F. Aïd<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institut National de Recherche Forestière (INRF), BP 37, Chéraga, Alger, Algérie.

<sup>2</sup> Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-chimique (CRAPC) B.P. 248 El Alia, Bab Ezzouar, Alger, Algérie

<sup>3</sup> Laboratoire de Physiologie Végétale (LPBO), Faculté des Sciences Biologiques- USTHB. B.P. 32 El Alia, Bab Ezzouar, Alger, Algérie

Auteur correspondant : [Guendouz\\_saida@inrf.dz](mailto:Guendouz_saida@inrf.dz); [moutchouaida@yahoo.fr](mailto:moutchouaida@yahoo.fr)

## ملخص

تم استخلاص الزيت العطري وجوهر إبر الصنوبر الحلبي (*Pinus halepensis* Mill.) باستخدام ثلاث طرق متتالية (التقطير المائي، النقع، سوكليت)، وتم تحليلهم باستخدام كروماتوغرافيا الغاز باستخدام كاشف الكوبلينغ/الكشف باللهب (CG/DIF) والكروماتوغرافيا الغازية - الكتلة الطيفية (CG/SM). تم الحصول على أعلى عدد للتربينات من خلال النقع (25) مقارنة بالطرق الأخرى (21 و 19). بين التربينات الرئيسية التي تم الحصول عليها من خلال الطرق الثلاث: كانت نسبتها أعلى في الزيت المستخلص بالنقع (21%، 20%) مقارنة بالتقطير المائي والسوكليت (13%، 10% و 8%، 13% على التوالي). *Trans β-caryophyllène* يمثل 17% من الزيت المستخلص بالنقع، و 28% من الزيت المستخلص بالسوكليت، و 25% من الزيت المستخلص بالتقطير المائي. من المقارنة مع الطرق الأخرى، المنتجات التي تم الحصول عليها بالنقع تظهر أقل درجة من التفكك مقارنة بالتقطير المائي والسوكليت، وبالتالي تكون أكثر اكتمالاً في تكوين التربينات. لذلك، يُعتبر النقع هو الأنسب للدراسات الكيميائية.

**الكلمات الرئيسية:** *Pinus halepensis* Mill., تيربينات، تقطير مائي، نقع، سوكليت، زيت أساسي، مستخلصات CG/DIF، مستخلصات CG/SM، تحديد الكمية.

## Abstract

The essential oil, extract, and essence of Aleppo pine needles (*Pinus halepensis* Mill.) were extracted using three extraction methods (hydrodistillation, maceration, and Soxhlet, respectively) and analyzed by CG/FID and CG/SM. The number of terpene compounds obtained by maceration was the highest (25) compared to the other two techniques (21 and 19). Among the major terpenes obtained by the three techniques: (a)  $\alpha$ -pinene and pinane, their proportions were higher in the essence extracted by maceration (21%, 20%) than in those obtained by hydrodistillation and Soxhlet (13%, 8% and 10%, 13% respectively); (b) *Trans-β-caryophyllene* represented 17% of the essence obtained by maceration, 28% of the essence obtained by Soxhlet extraction, and 25% for that obtained by hydrodistillation. Compared to the other two methods, the products obtained by maceration were less degraded than those obtained by hydrodistillation and Soxhlet, and therefore theoretically more complete in terms of terpene composition. Therefore, only maceration is suitable for chemotaxonomic studies.

**Keywords:** Extracts, CG/DIF, CG/SM, essential oil, hydrodistillation, maceration, *Pinus halepensis* Mill., quantification, Soxhlet, terpenes.

## Résumé

L'huile essentielle, l'extrait et l'essence des aiguilles de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) ont été extraits à l'aide de trois méthodes d'extraction (hydrodistillation, macération et soxhlet respectivement) et ont été analysés par CG/FID et CG/SM. Le nombre de composés terpéniques obtenus par macération est le plus élevé (25) comparativement aux deux autres techniques (21 et 19). Parmi les terpènes majoritaires obtenus par les trois techniques : (a) L' $\alpha$ -pinène et le pinane, leurs proportions sont plus élevées dans l'essence extraite par macération (21%, 20%) que dans celles obtenues par hydrodistillation et soxhlet (13%, 8% et 10%, 13% respectivement); (b) *Trans-β-caryophyllène*, il représente 17% de l'essence obtenue par macération, 28% de l'essence obtenue par extraction par soxhlet et 25% pour celle obtenue par hydrodistillation. Comparée aux deux autres méthodes, les produits obtenus par macération sont moins dégradés que ceux obtenus par hydrodistillation et par le soxhlet, et donc en principe plus complets en termes de composition en terpènes. Par conséquent, seule la macération convient aux études de chimiotaxonomie.

**Mots-clés :** Extraits, CG/DIF, CG/SM, huile essentielle, hydrodistillation, macération, *Pinus halepensis* Mill., quantification, soxhlet, terpènes.

## 1. Introduction

Le pin d'Alep présente une différenciation géographique sur plusieurs faciès (Maire, 1922 ; Kadik, 1986). C'est une espèce très prisée en reboisement et la sélection des provenances a toujours été faite de façon subjective. L'approche biométrique et forestière de sa variabilité demeure l'unique pratique. Sa caractérisation génétique et son potentiel d'adaptation et de résistance face au changement climatique demeurent jusqu'à présent inconnus.

Les forêts de pin d'Alep représentent une source importante de molécules bioactives dont les terpènes. Les propriétés de ces dernières ont été mises en évidence par de nombreuses investigations. (Abi-Ayad et al. 2011 ; Sadou et al. 2015 (Dahham et al. 2015 ; Porres-Martínez et al. 2016).

Les terpènes sont des métabolites secondaires. Ils dérivent tous d'une unité fondamentale, l'isoprène ( $C_5H_8$ ). Ils sont très nombreux et regroupent plusieurs familles chimiques. Les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ) et les sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ) représentent la fraction principale de l'huile essentielle. Par contre, les diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ), sont les produits stables présents dans les concrètes et les résines (Kesselmeier et Staudt, 1999 ; Lerdeau et Gray, 2003).

Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont des marqueurs de choix pour étudier des différences intra et inter-espèces (Pureswaren et al. 2004 ; Keeling and Bohlmann, 2006). Ils ont permis dans plusieurs cas, l'établissement d'une classification chimiotauxonomique entre espèces voisines (Baradat et al. 1995 ; Roussis et al. 1995 et 2000 ; Krause-Baranowska et al. 2002). Ces marqueurs biochimiques permettent également la sélection des chémotypes les moins sensibles aux maladies et aux attaques d'insectes chez le pin d'Alep (Michelozzi et al. 2004). Le taux des terpènes varie en fonction des saisons (Staudt et al. 2000 ; Hakola et al. 2003 ; Holzke et al. 2006 ; Moutchou et al. 2021), des procédés d'extraction (Richter & Schellenberg, 2007), des facteurs biotiques et abiotiques (Niinemets et al. 2002 ; Radušienė et al. 2012 ; Bartwal et al. 2013).

De nombreux travaux caractérisant l'activité biologique de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill.

ont montré une différence de composition terpénique de l'huile essentielle (Abi-Ayad et al. 2011 ; Sadou et al. 2015). Ces études ne représentent guère l'aire de répartition de l'espèce en question, vu qu'elles reposent sur un échantillonnage unique ou collectif. Une seule publication fait état de la variabilité géographique du pin d'Alep à l'échelle méditerranéenne par analyse terpénique des tissus corticaux (Baradat et al. 1995). A l'heure actuelle l'exploration de la variabilité génétique du pin d'Alep face aux changements climatiques futurs n'est pas de l'ordre du jour.

Les terpènes peuvent être extraits par différents procédés. Usuellement la technique d'hydrodistillation est utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, la macération et le Soxhlet pour l'obtention des extraits ou essences chez les résineux. La composition qualitative et quantitative varie en fonction de la méthode d'extraction (Baj et al. 2013 ; El Kamli et al. 2017 ; Triaux, 2019).

A travers cet article, nous présentons les résultats d'une étude comparative de trois techniques d'extraction des terpènes, réalisée afin de déterminer celle qui permet d'obtenir une composition terpénique sans artefacts et proche de celle du végétal. Cette étape est primordiale pour les études ultérieures sur la variabilité génétique, l'amélioration et la sélection d'écotypes résistants aux contraintes environnementales.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Stations de prélèvements

La récolte du végétal a eu lieu en hiver 2003. Les échantillons de tissus foliaires proviennent d'une forêt naturelle située à Bouchaoui.

Elle est localisée dans l'étage bioclimatique sub-humide, à une altitude de 115 m, sur une latitude de  $36^{\circ} 45' 12''$  et une longitude de  $2^{\circ} 54' 35''$ . La forêt de Bouchaoui regroupe plusieurs essences parmi lesquelles le pin d'Alep sur une superficie de 20 ha.

## 2.2. Matériel végétal

Le prélèvement du matériel végétal a eu lieu sur des rameaux latéraux de l'année, aoûtés, situés sur le tiers supérieur de l'arbre. Chaque provenance a été représentée par un échantillon moyen issu d'un mélange en quantité égale de rameaux (un rameau/arbre) provenant de 30 individus différents. La récolte a été effectuée sur des arbres sains, ne présentant pas de coulées de résine ou de piqûres d'insectes. Les rameaux excisés ont été placés dans des sacs en plastique hermétiquement clos et conservés au froid (+4°C).

## 2.3. Méthodes d'extraction des monoterpènes et sesquiterpènes

Différents procédés d'extraction ont été utilisés : l'hydrodistillation, technique conventionnelle pour les huiles essentielles, le soxhlet et la macération, pour les extractibles.

## 2.4. Extraction par hydrodistillation

Cette extraction consiste à immerger la matière végétale dans un alambic rempli d'eau qui est portée à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant puis récupérées dans un Erlen Meyer et l'huile essentielle est séparée par décantation. Le dispositif d'extraction en verre est nommé Clevenger. 100 g d'aiguilles, matière végétale sont lavés puis introduits dans un ballon monocol d'une capacité de 6 litres rempli par 2 litres d'eau. Le ballon est raccordé à un appareil de type Clevenger. Une calotte chauffante sur laquelle repose le dispositif d'extraction est utilisée comme source de chaleur. La diffusion de la vapeur d'eau à travers la matière végétale permet d'en extraire les matières volatiles et de les récupérer en haut du montage. Ces vapeurs sont condensées dans le réfrigérant à circulation d'eau et l'huile essentielle est récupérée par décantation. Celle-ci, de couleur jaune pâle, est séchée par addition de 1% de sulfate de sodium anhydre. Après filtration, l'huile essentielle est conservée dans un flacon ambré, fermé hermétiquement et à basse température (4°C).

## 2.5. Extraction par Soxhlet

Dix gramme (10 g) d'aiguilles coupées en menus

morceaux sont placés dans une cartouche d'extraction introduite au préalable dans l'extracteur de type Soxhlet. Le solvant d'extraction, traverse d'abord le végétal puis arrive au ballon. Ce dernier est chauffé ; la vapeur du solvant passe par la tubulure, se condense dans le réfrigérant et retombe sous forme de gouttelettes sur le végétal. L'extraction dure trois heures et correspond à plusieurs cycles d'extraction afin d'épuiser la matière végétale. Après avoir éliminé le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide, un extrait pâteux ou concrète de couleur vert foncé est obtenu. L'absolue ou essence de couleur verte a été obtenue par ajout d'éthanol à la concrète dans un rapport de volumes 1:2.

## 2.6. Extraction par macération

Une masse de 10 à 15 g de tissus foliaires broyés a été mise à macérer pendant trois heures dans 30 ml de pentane à 99%. L'extrait obtenu de couleur verte a été ensuite séché sur sulfate de sodium anhydre (1%). Le filtrat obtenu contient des mono- et sesquiterpènes, des terpènes oxygénés, des lipides, des acides résiniques, et des pigments. Les composés lourds pouvant interférer lors de l'analyse par chromatographie phase gazeuse ou nuire à la sensibilité, sont éliminés par un préfractionnement. L'extrait a été fractionné sur gel de silice 60 (Merck 70-230 mesh), dans une colonne chromatographique (longueur : 15 cm, diamètre : 1 cm). L'éluution est réalisée par 30 ml d'un mélange pentane-éther diéthylique (98:2) permettant l'isolement d'un éluat ou essence de couleur jaune. L'essence a ensuite été concentrée à un faible volume (1 à 2 mL) par évaporation sous azote pour éviter toute oxydation. Les échantillons ont ensuite été conservés dans des flacons bruns au froid (- 4°C).

## 2.7. Analyse chromatographique à détecteur à ionisation de flamme (CG/DIF)

La séparation des terpènes a été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett Packard HP 6890 muni d'un détecteur à ionisation de flamme, d'une colonne capillaire est apolaire HP5MS avec 5% de groupements diphényle et 95% de diméthyle. Elle est faite en silice fondue avec les dimensions suivantes : longueur 30 mètres, diamètre extérieur 0,25 mm, épaisseur du

film de phase stationnaire : 0,25  $\mu\text{m}$ . Le gaz vecteur est l'azote (débit de 0,62 ml/mn). L'analyse chromatographique a été effectuée en programmation de température à raison de 2°C/mn après une temporisation de 8 minutes à 60°C. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C. Le volume injecté est de 1  $\mu\text{L}$ . En parallèle, nous avons injecté une série d'alcane linéaires (de C<sub>5</sub> à C<sub>28</sub>) dans les mêmes conditions opératoires pour calculer les indices de rétention des constituants de chaque extrait selon l'équation de Van den Dool et Cratz (1963). La teneur de chaque constituant dans l'essence totale (hydrocarbures monoterpéniques, sesquiterpéniques et diterpéniques) a été calculée par intégration automatique de la surface des pics sur les chromatogrammes et exprimée en pourcentage

### 2.8. Analyse par couplage chromatographie phase gazeuse – spectrométrie de masse

L'analyse a été menée sur un appareil Hewlett Packard du type HP-MSD 6890. La colonne utilisée est du type HP 5 MS de 30 mètres. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à un débit de 0,5 mL/mn, le volume injecté étant de 0,2  $\mu\text{L}$  en mode « split » (diviseur d'entrée). Le spectromètre de masse couplé au chromatographe est de type Hewlett Packard MSD 5973 relié à une station de traitement de données. Le mode d'ionisation est par impact électronique avec une tension d'ionisation de 70 eV. Le courant du filament est de 100 $\mu\text{A}$  et la température de la source est fixée à 230°C. La pression dans la source est égale à 10<sup>-6</sup> Torr alors que l'interface utilisée est de type couplage direct de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film. La température est programmée selon le même gradient utilisé auparavant en CPG seule.

## 3. Résultats

Les constituants des essences étudiées ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (Adams, 1995) et de leurs spectres de masse à ceux des composés de référence publiés dans la littérature (NIST, 1999). Terpène Library of Finningan). La surface des pics sur les chromatogrammes obtenus a été exprimée en pourcentage de chaque constituant par rapport à l'essence to-

tales, par intégration automatique. Les composés à trop faible concentration (inférieure à 0.1%) sont considérés comme étant à l'état de trace.

L'analyse par CG/DIF et CG/SM des essences extraites par les trois procédés nous a permis d'identifier 18 composés dans l'essence extraite par hydrodistillation, 22 par macération et 15 par soxhlet.

L'étude comparative des profils terpéniques relatifs aux trois essences (Tableau 1), a montré que : L'huile essentielle distillée par hydrodistillation contient 34% de monoterpènes, 45% de sesquiterpènes, 10% d'alcane et 2% de diterpènes. L'essence obtenue par macération est caractérisée par une fraction monoterpénique prédominante (47%) et d'importantes fractions d'hydrocarbures (25%) et sesquiterpéniques (22%). Dans le cas de l'extraction par soxhlet, les sesquiterpènes représentent 37% de l'essence totale, les monoterpènes 21%, les alcane 18% et les esters 10%.

Parmi les monoterpènes majoritaires obtenus par les trois techniques, l' $\alpha$ -pinène est omniprésent dans les trois fractions (Tableau 1). Sa proportion est plus élevée dans l'essence extraite par macération (21%) que dans celles obtenues par hydrodistillation et soxhlet (13% et 10% respectivement). Le camphène est exclusif à la macération, il représente 15% de l'essence totale. Le mélange Fenchone/  $\gamma$ -terpinolène est à 9% dans le cas de la macération et absent dans les huiles extraites par hydrodistillation et par le soxhlet. Le sabinène est fortement représenté lorsque l'essence est extraite par hydrodistillation (17%) et à l'état très réduit voire traces dans les essences extraites par les deux autres techniques.

Chez les sesquiterpènes, les constituants majoritaires sont représentés par le trans- $\beta$ - caryophyllène et l' $\alpha$ -humulène. Ils représentent respectivement 17% et 2% de l'essence obtenue par macération et 28% et 5% de l'essence obtenue par extraction par soxhlet. Dans le cas de l'hydrodistillation, les composés prépondérants sont le trans- $\beta$ - caryophyllène (25%) et le  $\gamma$ -cadinène (13%).

La famille des hydrocarbures est présente dans les trois types d'extraits. Le pinane est un alcane majoritaire dans cette famille. Son taux est de 20% quand le procédé d'extraction est la macération, 13% et 8% respectivement pour le soxhlet et l'hydrodistillation. Un autre alcane insaturé, le 1, 3,8 menthatriène se trouve à un taux de 10% dans

**Tableau 1.** Composition semi-quantitative des essences foliaires extraites par macération, soxhlet et distillation exprimée en %. L'extraction a été réalisée sur un échantillon moyen de 30 arbres différents provenant de la forêt de Bouchaoui et l'analyse a été effectuée par CG/DIF ; CG/SM en mode IE .

Familles chimiques	Composition	Techniques d'extraction		
		Hydrodistillation (%)	Macération (%)	Soxhlet (%)
<b>Monoterpènes</b>	α-pinène	12,77	20,99	10,10
	camphène	-	14,85	-
	sabinène	17,08	tr	1,16
	β-pinène	tr	1,24	tr
	β-myrcène	1,23	-	1,38
	α-phellandrène	tr	tr	0,83
	δ-3-carène	1,60	-	-
	limonène+eucalyptol	0,58	0,68	tr
	γ-terpinène	1,06	-	-
	<b>Total</b>	<b>34,32</b>	<b>37,76</b>	<b>13,47</b>
<b>Sesquiterpènes</b>	α-copaène	1,30	0,62	1
	A-guaiène	-	1,04	-
	Trans-β-caryophyllène	25,11	17,10	27,98
	α-humulène	2,81	2,66	5,19
	γ-murolène	1,75	tr	-
	Germacrène D	-	0,48	-
	β-saliène	-	0,40	-
	α-farnésène	-	0,16	-
	γ-cadinène	12,83	-	3,38
	<b>Total</b>	<b>30,97</b>	<b>22,46</b>	<b>35,55</b>
<b>Hydrocarbures</b>	Pinane	8,53	19,95	13,10
	1,3,8 menthatriène	10,11	-	-
	Nonane	-	2,63	4,71
	Décane	0,59	2,29	-
	Dodecane	0,12	-	-
		<b>Total</b>	<b>19,35</b>	<b>24,87</b>
<b>Cétones</b>	Fenchone+ α-terpinolène	-	9,35	-
	<b>Total</b>		<b>9,35</b>	
<b>Esters</b>	Benzylalcool	-	0,33	-
	Phenylethylisovalérate	-	3,43	10,65
	<b>Total</b>		<b>3,76</b>	<b>10,65</b>
<b>Aldéhydes</b>	Benzaldéhyde	-	tr	4,68
	<b>Total</b>		<b>tr</b>	<b>4,68</b>
<b>Terpènes alcools</b>	Linalool	-	0,52	-
	Terpin-4-ol	0,47	tr	-
	Abiétol-néo	-	-	0,96
	<b>Total</b>	<b>0,47</b>	<b>0,52</b>	<b>0,96</b>
<b>Ethers-oxides</b>	Caryophyllène oxide	-	0,65	-
	<b>Total</b>		<b>0,65</b>	
<b>Diterpènes</b>	Cembrene	1,20	-	3,22
	Néocembrene	0,63	-	3,38
	<b>Total</b>	<b>1,58</b>		<b>6,6</b>

l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation. Les autres hydrocarbures comme le nonane, décane et le dodécane sont retrouvés à des proportions réduites quel que soit le mode d'extraction.

La composition en esters se limite aux benzyle alcool et au phényle éthyle isovalérate quand le mode d'extraction est la macération avec des taux assez faibles. Alors que dans le cas du soxhlet le phényle éthyle isovalérate représente 10% de l'essence totale.

La fenchone est une cétone retrouvée en mélange avec l' $\alpha$ -terpinolène est spécifique à la macération ; elle représente 9% de l'essence totale.

Parmi les diterpènes, le cembrene et le néocembrene sont retrouvés dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation à des taux très faibles (1% et 0.6% respectivement). Alors que dans l'essence obtenue par soxhlet, ces diterpènes représentent chacun 3% de l'essence totale.

En ce qui concerne les aldéhydes contenus dans nos essences, un seul composé, le benzaldéhyde. Il caractérise l'essence extraite par soxhlet avec une proportion de 4%.

Les alcools sont représentés par le linalool, terpin-4-ol et l'abiétole. Ils sont présents dans les essences obtenues par les trois types d'extraction (macération, hydrodistillation et soxhlet) à des proportions réduites.

Chez les éthers oxydes le caryophyllène oxide est faiblement représenté dans l'essence obtenue par macération (Tableau 1).

#### 4. Discussion

Au cours de l'hydrodistillation, milieu aqueux résultant de l'immersion du végétal atteint des pH compris entre 4,0 et 7,0 (Koedem, 1987). L'eau chaude passe dans les tissus, dissout les constituants présents dans les cellules. L'huile essentielle diffuse à travers les parois cellulaires et passe en surface. Les constituants de l'essence sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur et peuvent subir des modifications chimiques. Des réactions chimiques diverses : hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisations peuvent être catalysées par des métaux présents à l'état de traces dans le végétal (Chen and Spiro, 2004 ; Lagunez, 2006). L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit ; elle conduit à la for-

mation d'acides organiques qui à leur tour catalysent des réactions de cyclisation et de déshydratation (Teisseire, 1987). Par conséquent, la composition terpénique obtenue diffère sensiblement de celle de l'essence originelle.

Dans le cas de l'extraction par soxhlet, le solvant chaud a la faculté de solubiliser les monoterpènes, les sesquiterpènes et les produits liposolubles. De plus, l'élévation de la température peut décomposer les molécules. Les composés en surface des parois du végétal s'évaporent. La limite d'évaporation de chaque constituant est fixée par sa tension de vapeur dans les conditions du milieu. Le solvant à un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils, mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances (Hernandez Ochoa, 2005).

La macération a lieu à température ambiante et n'altère pas la composition chimique des composés thermolabiles. L'absence d'eau permet également de préserver les substances volatiles de l'hydrolyse. Ainsi, les composés thermosensibles et hydrolysables ne sont pas altérés. Le pentane utilisé est un solvant apolaire qui a permis de concentrer les constituants volatils vu son faible point d'ébullition. Cette technique a nécessité un faible coût de l'appareillage avec facilité de l'opération d'extraction par rapport aux deux autres techniques. L'extrait obtenu par macération est un des extraits qui se rapproche le plus de la matière première comparative à l'huile essentielle et la concrète obtenues par hydrodistillation et le soxhlet.

Comparativement, cette technique a libéré une teneur importante en monoterpènes (47,11%), monoterpènes hydrocarbures (24,87%) et en sesquiterpènes (22,46%).

Les résultats obtenus montrent que les aiguilles de pin d'Alep en provenance de Bouchaoui sont riches en hydrocarbures de type monoterpéniques et sesquiterpéniques et ce quel que soit la technique d'extraction utilisée. Ces résultats concordent avec ceux rapportés sur l'huile essentielle des aiguilles de pin d'Alep extraite par hydrodistillation en provenance d'Espagne, (Zafra & García-Peregrín, 1976) ; d'Italie (Vidrich et al. 1988 ; Macchioni et al. 2003), de Grèce (Roussis et al. 1995), de Turquie (Ustun et al. 2012), de l'Algérie (Fekih et al. 2014) et du Maroc (Hmamouchi et al. 2001).

Ces auteurs ont signalés l'abondance de l' $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -myrcène et le  $\beta$ -caryophyllène. Cependant dans la présente étude, le  $\beta$ -myrcène est présent à l'état de trace. De même d'autres hydrocarbures monoterpéniques (sabinène, camphène, couple terpinolène/Fenchone, pinane ainsi que le 1, 3, 8 - menthatriène) majoritaires et présents dans l'échantillon étudié ne le sont pas chez les provenances citées.

Certains auteurs ont mis en évidence la prépondérance des hydrocarbures sesquiterpéniques tels que l' $\alpha$ -élémyène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -caryophyllène et l'aromadendrène (Dob et al. 2007 ; Dziri et Hosni, 2012 ; Fekih et al. 2014). Certaines provenances de *Pinus halepensis* Mill. ont été caractérisées également par leur richesse en diterpènes comme le cembrene (Roussis et al. 1995) et le thunbergol (Abi-Ayad et al. 2011). D'autres recherches menées sur l'extraction des métabolites secondaires des aiguilles de cette espèce dans l'optique de développement des techniques d'analyses ont révélé la présence des phényles esters en fortes teneurs (Tazerouti et al. 1993)

Cette différence de composition de l'huile essentielle des aiguilles du pin d'Alep serait due à plusieurs facteurs dont la saison et le lieu de récolte, stade phénologique, type de substrat, état sanitaire de l'arbre, l'altitude et le mode d'extraction.

## 5. Conclusion

Les analyses de l'huile essentielle et extraits par chromatographie en phase gazeuse montrent que les compositions chimiques et les composés majoritaires sont différents et variables selon les méthodes d'extraction utilisées. La méthode d'extraction des huiles essentielles intervient de façon déterminante dans la composition de l'huile essentielle. La composition de l'essence change en fonction du procédé d'extraction. L'hydrodistillation est préconisée pour l'extraction de molécules aromatiques d'origines végétales mais aussi dans l'agroalimentaire pour la détermination qualitative et quantitative de molécules aromatiques présentes dans certains produits alimentaires. Le soxhlet convient à l'extraction des teintures, résinoides ou extraits éthanoliques et concrète. La macération a permis d'obtenir une essence à froid avec le pen-

tane. C'est la seule technique où l'essence n'est pas sujette à l'effet de la température et du pH. Elle ne contient que des composés apolaires. Le nombre d'hydrocarbures monoterpéniques obtenus par macération est le plus élevé comparativement aux deux autres techniques. De plus, l'avantage essentiel de la macération vient du fait que les produits obtenus sont moins dégradés que ceux obtenus par hydrodistillation et par le soxhlet, et donc en principe plus complets sur le plan composition en terpènes. Par conséquent, seule la macération convient aux études de chimiotaxonomie.

## Remerciements

Cette recherche a été financée par un projet MERS, dont le porteur est Feu Khemici Mohamed. Toute la composante de l'article lui est redevable et tiens à lui exprimer ses hommages pour son travail, éthique et dévouement. Nous exprimons nos vifs remerciements au personnel technique de la circonscription de la forêt de Bouchaoui ainsi que celui du laboratoire du CRAPC/USTHB pour l'aide technique

## Références

- Abi-Ayad, M., Abi-Ayad, F. Z., Lazzouni, H. A., Rebiahi, S. A., & Ziani-Cherif, C. (2011). Chemical composition and antifungal activity of Aleppo pine essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (22), 5433-5436.
- Adams, R.P. (1995). *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*. Carol Stream, IL, Allured Publishing Corporation
- Baradat, P., Michelozzi, M., Tognetti, R., Khouja, M. L. & Khaldi, A. (1995). Geographical variation in the terpene composition of *Pinus halepensis* Mill. Academic Publishing
- Baj, B., Ludwiczuk, A., Sieniawska, E., skalickawozniak, K., Widelski, J., Zieba, K., & Glowniak, K. (2013). GC-MS analysis of essential oils from *Salvia officinalis* L.: Comparison of extraction methods of the volatile components. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 70 (1), 35-40.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., & Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *J. Plant growth Regulation*. 32, 216-232.
- Chen S.S., & Spiro, M. 1995. Kinetics of microwaves ex-

- traction of rosemary leaves in hexane, ethanol and a hexane + ethanol mixture. *Flavour Fragrance Journal*, 10, 101-112.
- Christianson, D.W. (2006). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* 106 (8), 3412-3442.
- Dahham, S.S. Tabana, Y.M., Iqbal, M.A., Ahamed, M.B.K., Ezzat, M.O., Majid, A.S.A., & Majid, A.M.S.A. (2015). The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene  $\beta$ -Caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 20 (7), 11808-11829.
- Dob, T., Berramdane, T., & Chelghoum, C., (2007). Essential oil composition of *Pinus halepensis* Mill. from three different regions of Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19, 40-43
- Dziri, S., & Hosni, K. (2012) Effects of cement dust on volatile oil constituents and antioxidative metabolism of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill) needles. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 1669-1678.
- EL Kamli, T., Errachidi, F., Eloutassi, N., Houmane, M., Chabir, R., & Bour A. (2017). Comparaison Quantitative Et Qualitative Des Huiles Essentielles De Rosmarinus Officinalis Obtenues Par Différentes Méthodes. *European Scientific Journal*. 13 (21) p 172.
- Fekih, N., Allali, H., Merghache, S., Chaïb, F., Merghache, D., EL Amine, M., Djabou, N., Muselli, A., Tabti, B., & Costa, J. (2014) Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in west northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 97-103.
- Hakola, H., Tarvainen, V., Laurila, T., Hiltunen, V., Hellén, H., & Keronen, P. (2003). Seasonal variation of VOC concentrations above a boreal coniferous forest. *Atmospheric Environment* 37 (12), 1623-1634.
- Hernandez Ochoa, L. R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat en Science des Procédés (option Sciences des Agro ressources), Institut National Polytechnique, Toulouse, France
- Holzke, C., Hoffmann, T., Jaeger, L., Koppmann, R., & Zimmer, W. (2006). Diurnal and seasonal variation of monoterpene and sesquiterpene emissions from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Atmospheric Environment*. 40 (17), 3174-3185.
- Hmamouchi, M., Hamamouchi, J., Zouhdi, M., & Bessiere, JM. (2001) Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan Pinaceae. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 298-302.
- Kadik, B. (1987). Contribution à l'étude du Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie : écologie, dendrométrie, morphologie (Doctoral dissertation).
- Keeling, C.I., & Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 170 (4), 657-67.
- Koedam, A. (1987). Some aspects of essential oil preparation in capillary gas chromatography in essential oils analysis. Sandra P., Bicchi C. Herdelberg, New York, pp 13-27.
- Krause-Baranowska, M., Mardarowicz, M., Maian Wiwart, C., Poblocka, L., & Dynowska, M. (2002). Antifungal Activity of the Essential oils from Species of the Genus *Pinus*. *Zeitschrift fur Natuforschung- Section C- Biosciences*. 57 (5-6). 478-482.
- Lerdau, M., & Gray, D. (2003). Ecology and evolution of light dependent and light-independent phytochemical volatile organic carbon. *New Phytologist*, 157(2), 199-211 organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of atmospheric chemistry*, 33 (1), 23-88
- Kesselmeier, J., & Staudt, M. (1999). Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of atmospheric chemistry*, 33 (1), 23-885.
- Lagunez Rivera, L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétale en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. 335 pp
- Maire, R. (1926). Carte phytogéographique de l'Algérie et de la Tunisie. Alger, Baconnier, 78pp.
- Macchioni, F. Cioni, PL. Flamini, G., Morelli, I. Maccioni, S., & 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. *Flavour Fragrance Journal*, 18, 139-143.
- Moutchou, S., Badjah-Hadj-Ahmed, Y., Khemici, M., & Aïd, F. (2021). Evolution saisonnières des terpènes de l'écorce et des aiguilles chez le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) *Annale de Recherche Forestière. Algérie*, 11(01), 31-41.
- Niinemets, Ü., Reichstein, M., Staudt, M., Seufert, G., & Tenhunen, J. D. (2002). Stomatal constraints may affect emission of oxygenated monoterpenoids from the foliage of *Pinus pinea*. *Plant Physiology*, 130 (3), 1371-1385.
- N.I.S.T. (1999) National Institute of Standards and Technology. PC Version 1.7. The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Perkin Elmer Corporation: Norwalk, CT.
- Peng, F., Sheng, L., Liu, B., Tong, H., & Liu, S. (2004). Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves. *Journal of Chromatography A*, 1040 (1), 1-17.
- Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carter, M.E., & Gómez-Serranillos, M.P. (2016). In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1, 8-cineole against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in PC12

- cells. Z. Naturforsch., C, J. Bioscience. 71 (7-8), 191-199.
- Pureswaren, D.S., Gries, R., & Borden, J.H. (2004). Quantitative variation in monoterpenes in four species of conifers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32 (12), 1109-1136.
- Kesselmeier, J., & Staudt, M. (1999). Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of atmospheric chemistry*, 33(1), 23-88.
- Radušienė, J., Karpavičienė, B., & Stanius, Ž. (2012). Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's worth. *Bot. Lith.* 18 (2), 101-108.
- Richter, J., & Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography Analytical and. *Bioanalytical Chemistry*. 387 (6), 2207.
- Roussis, V., Petrakis, P.V., Ortiz, A., & Mazomenos, B.E. (1995). Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*, 39, 357-361.
- Roussis, V., Tsoukatou, M., Petrakis, P.V., Chinou, I., Skoula, M., & Harborne, J.B. (2000). Volatile constituents of four *Helychrysum* species growing in Greece. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 163-175.
- Sadou, N., Seridi, R., Djahoudi, A., & Hadeif, Y. (2015). Composition chimique et activité antibactérienne des Huiles Essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. du Nord Est Algérien. *Synthèse : Revue des Sciences et de Technologie*. 30, 33-39
- Spiro, M., & Chen, S.S. (1995). Kinetics of isothermal and microwave extraction of essential oil constituents of peppermint leaves into several solvent systems. *Flavours and Fragrance Journal*, 10 (4), 259-272
- Takahashi, S., & Koyama, T. (2006). Structure and function of cis-prenyl chain elongation enzymes. *Chemical Record*. 6 (4), 194-205.
- Tazerouti, F., Badjah-Hadj-Ahmed, Y., Meklati, B.Y., Favre-Bonvin, J., & Bobenrieth MJ. (1993) Analyse des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. par C.G.-S.M. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 26, 161-176
- Teisseire, P. (1987). Industrial quality control of essential oils by capillary G.C. in *Capillary Gas Chromatography in Essential oil Analysis*. Sandra, P & Bicchi, C. Heidelberg, New York. pp 215-258
- Triaux, Z. (2019). Développement et méthodes d'extraction d'analyse de molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire. Thèse de doctorat. Ecole doctorale de sciences chimiques. Université de Strasbourg. 273 pp.
- Ustun, O., Senol, F.S., Kurkcuoglu, M., Orhan, I.E., Kartal, M., & Baser, K.H.C. (2012). Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products*, 38, 115-123.
- Van den Dool, H., & Kratz, P.D. (1963). A generalization of the retention of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal Chromatography A* 11, 463-471.
- Vidrich, V., Michelozzi, M., Fusi, P., & Heimler, D. (1988). Essential oils of vegetables species of the Mediterranean and alpine temperate climate areas. In *Proceedings of the 4th E.C. Conference, Biomass for Energy and Industry*, Grassi G, Delmon B, Molle JF, Zibetta H (Eds). Elsevier Applied Science, London, 963-967.
- Wise, M.L., & Croteau, R. (1999). *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Cane, DE, Ed.
- Zafra, M., & García-Peregrín, E. (1976). Seasonal variations in the composition of *Pinus halepensis* and *Pinus sylvestris* twigs and needles essential oil. *The Journal of Agricultural Science*, 86, 1-6.