

COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉS ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET INSECTICIDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Juniperus phoenicea*

N. Bouzouita^a, F. Kachouri^a, M. Ben Halima^b, M. M. Chaabouni^{a*}

^a Ecole Supérieure des Industries Alimentaires,
58, Avenue Alain Savary, 1003 Tunis, Tunisie

^b Institut Supérieur des Sciences Agronomiques de Chott Meriem, Tunisie

(Reçu le 15 Avril 2008, accepté le 11 Juillet 2008)

RÉSUMÉ : La composition chimique de l'huile essentielle extraite des feuilles séchées de *Juniperus phoenicea* récoltées de la région de Medenine (Sud de la Tunisie) a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CPG et CPG/SM). Vingt sept constituants, représentant 84,63% de l'huile essentielle ont été identifiés. Les composés majoritaires sont : l' α -pinène (59,11%) ; le linalool (3,3%) ; le germacrène D (1,55%) ; le germacrène B (3,22%). L'étude de l'activité antioxydante de l'huile de *Juniperus phoenicea* sur une huile végétale : l'huile de soja, une comparaison avec un antioxydant usuel le δ -tocophérol ont montré que cette huile a manifesté un effet antioxydant et qu'elle a permis une stabilisation du saindoux. L'étude de l'effet antimicrobien a montré que cette huile a un effet inhibiteur vis-à-vis de quatre microorganismes, *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Geotrichum candidum*. Les propriétés insecticides de l'huile de *Juniperus phoenicea* sont testées contre un insecte des denrées stockées *Tribolium confusum*, cette huile a manifesté un effet anti-appétant intéressant. Une étude préliminaire a montré que cette huile présente une toxicité élevée vis-à-vis de cet insecte.

Mots clés : *Juniperus phoenicea*; Huile essentielle; Activité antimicrobienne ; Activité antioxydante ; Activité insecticide.

ABSTRACT: The essential oil composition of the leaf of *Juniperus phoenicea* from region of Medenine (The south of Tunisia) was investigated by GC, GC-MS. 27 constituents were identified correspond to 84.63% of the total oil. The major components are α -Pinene (59.11%), Linalool (3.3%), Germacrene D (1.55%) and Germacrene B (3.22%). Antioxidant action of this essential oil is proved in vegetal oil (soybean) and was effective in stabilizing lard against oxidation. Its activity is compared to that of δ -tocopherol. This oil has been tested for antimicrobial activity against two bacteria (*Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus plantarum*), yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and fungi (*Geotrichum candidum*). Insecticidal properties of *Juniperus phoenicea* essential oil were investigated against *Tribolium confusum* insect pest of stored grains. This oil exhibited an interesting antifeedant activity. A preliminary study showed that this oil presented high toxicity against this insect.

Keywords: *Juniperus phoenicea*; Essential oil; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Insecticidal activity.

1. INTRODUCTION

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles. Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. L'étude des activités biologiques et biotechnologique des extraits de plantes est d'un grand intérêt. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été rapportées dans plusieurs travaux [1-8]. Dans la plupart des cas ces activités sont attribuées aux mono terpènes oxygénés [9]. L'utilisation des molécules naturelles

* correspondant, e-mail : chaabouni.medmoncef@iresa.agrinet.tn

pour remédier au phénomène d'oxydation des corps gras, ses conséquences sur la santé et ses répercussions économiques ont fait l'objet de plusieurs recherches. De nombreux travaux sur les activités antioxydantes des huiles essentielles d'une grande variété de plantes aromatiques montrent que ces propriétés sont en relation avec la composition chimique, Shahidi *et al.* [10] ont rapporté que les activités antioxydantes sont dues à la présence de composés qui comportent le groupement hydroxyle [10]. D'autre part nous savons que la conservation des denrées entreposées est généralement assurée par des insecticides de synthèse qui peuvent être le moyen le plus efficace et le moins coûteux pour contrôler les insectes. Cependant l'utilisation abusive des insecticides chimiques a des effets négatifs. Des travaux sont effectués dans ce contexte et ont montré une efficacité des extraits des plantes [11]. En effet les plantes constituent une source de substances naturelles qui présente un grand potentiel d'application contre les insectes et d'autres parasites des plantes et du monde animal. L'objet du présent travail est de tester les activités biologiques de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Extraction et analyse de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*

2.1.1. Extraction

100 g de matériel végétal sont placés dans un ballon d'un litre contenant 300 ml d'eau. Le ballon est surmonté d'un Dean Stark et d'un réfrigérant ascendant. Le mélange est porté à reflux à l'aide d'un manteau chauffant. Les essences sont alors entraînées par la vapeur d'eau, condensées puis séparées par le Dean Stark. Le reflux est poursuivi jusqu'à ce que le distillat apparaisse parfaitement limpide. La décantation du distillat donne deux phases :

- Une phase organique sous forme d'une huile légèrement colorée et d'odeur assez forte.
- Une phase aqueuse qu'on extrait à l'éther diéthylique, dans le but d'augmenter le rendement en huile essentielle et qui donne après évaporation du solvant une deuxième phase organique qu'on regroupe avec la première. L'huile essentielle obtenue est séchée sur du sulfate de sodium anhydre et est conservée à une température de - 4°C.

2.1.2 Analyse

L'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* est analysée en CPG avec un chromatographe HP 5890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les analyses en CPG couplée à la spectrométrie de masse sont réalisées avec un chromatographe HP 6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5973 N. Les conditions d'analyses de ces deux échantillons sont les suivantes :

- Colonne : HP-5 MS 5% phényl méthyl siloxane (30m × 0,25 mm, ef = 0,25µm)
- Gaz vecteur : Hélium
- Mode : Split 1 :10
- Débit : 0,9 ml/mn
- Température de l'injecteur : 250°C
- Température du détecteur : 280°C
- Programme de température : 40°C (1mn)- 5°C /mn- 250°C

Pour les différentes analyses la colonne et les conditions utilisées pour la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sont les mêmes que celles utilisées en chromatographie en phase gazeuse. Nous avons confirmé et complété nos analyses par CPG et CPG/SM en comparant les indices de rétention des différents composés avec les indices de rétention donnés dans la littérature.

2.2. Analyse microbiologique

2.2.1. Milieux de culture

Les milieux de culture liquides utilisés sont : bouillon nutritif pour *Klebsiella oxytoca*, bouillon Sabouraud pour *Geotrichum candidum* et *Saccharomyces cerevisiae* et bouillon MRS (Man Sharpe and Rogosa) pour *Lactobacillus plantarum*.

2.2.2. Microorganismes utilisés

L'effet antimicrobien est testé sur quatre microorganismes :

- Une bactérie Gram - : *Klebsiella oxytoca* isolée à partir du sol et conservée sur milieu gélosé PCA à 4°C
- Une bactérie Gram + : *Lactobacillus plantarum*, isolé à partir des olives fermentées et conservée sur milieu gélosé MRS à 4°C.
- Une levure : *Saccharomyces cerevisiae* isolée à partir de la levure boulangère et conservée sur milieu gélosé Sabouraud à 4°C.
- Une moisissure : *Geotrichum candidum* isolée à partir des margines et conservée sur milieu gélosé Sabouraud à 4°C.

2.2.3. Préparation des cultures

L'analyse microbiologique a pour principe de mettre à chaque fois une souche microbienne en contact avec l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* émulsionnée dans le Tween 80 (V/V) et à différentes concentrations (0% ; 0,05% ; 0,075% ; 0,1% ; 1,5% ; 2,5% et 3,5%) et ce dans un milieu de culture liquide approprié pour chaque micro organisme. Après incubation à 37°C pendant 24 heures pour *Klebsiella oxytoca* et *Lactobacillus plantarum* et à 30°C pendant 24 heures pour *Saccharomyces cerevisiae*, l'effet antimicrobien est déterminé par la mesure de la concentration cellulaire (UFC/ml). Pour *Geotrichum candidum*, cet effet est déterminé par la mesure de la biomasse microbienne (DO 600) après 24 heures d'incubation à 30°C.

2.3. Corps gras et suivi de l'activité antioxydante

Nous avons testé l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *J. phoenicea* sur un corps gras (le saindoux) et sur une huile végétale (l'huile de soja) et nous avons procédé à une comparaison avec un antioxydant usuel le δ -Tocophérol. Un suivi de l'indice de peroxyde (méthode de Wolf) du saindoux et de l'huile de soja en fonction du temps et pendant 17 jours de conservation à 65°C en présence de l'huile essentielle à une concentration de 200 ppm a été effectué. La comparaison avec le δ -Tocophérol a été effectuée à la même concentration.

2.4. Matériel animal et suivi de l'activité insecticide

Les insectes sont disponibles au laboratoire de zoologie agronomique de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques de Chott Mariem. L'élevage de *T. confusum* permet d'avoir à chaque fois une génération homogène. Un groupe de 10 insectes adultes est mis dans un tube à essai avec un milieu nutritionnel (composé de 95% de semoule + 5% de levure), ces tubes sont par la suite mis dans une étuve à 30°C et à l'obscurité pour garantir des conditions favorables pour leur multiplication. La descendance de cette génération est utilisée aux différents essais d'anti-appétence et de toxicité.

L'expérience consiste à placer chaque insecte adulte accompagné d'un grain de blé enrobé d'huile essentielle dans un tube à hémolyse qui sera fermé par du coton pour garantir l'entrée de l'air à l'insecte. Notons que les grains de blé doivent être séchés à l'air libre pendant 1h avant utilisation. Ces tubes sont mis dans une étuve (T=30°C ; obscurité). Au bout de 48h, le poids du grain de blé est mesuré. De même un suivi de la mortalité est effectué.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*

Le rendement en huile essentielle est de 0,5%. Sa composition chimique, rapportée dans le Tableau I comprend comme composés majoritaires l' α -pinène (59,11%), le linalool (3,3%), le germacrène D (1,55%) et le germacrène B (3,22%). Cette huile est caractérisée par un taux élevé d'un monoterpène hydrocarboné l' α -pinène. L'étude de la composition chimique de l'huile de cette même plante, mais d'autres provenances, a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche [12-14]. Les résultats obtenus pour les différents travaux montrent que cette huile est formée principalement d' α -pinène.

Tableau I : Composition chimique de l'huile essentielle de *J. phoenicea* récolté dans le sud de la Tunisie

Composants	IK	%
Tricyclène	920	0,21
α-Pinène	931	59,1
Camphène	943	0,29
β -Pinène	970	0,60
Myrcène	979	1,14
α -Terpinène	1008	0,47
p-Cymène	1011	0,34
Limonène	1020	1,11
γ -Terpinène	1047	0,25
Trans-Oxyde de linalool	1096	0,22
Terpinolène	1097	0,45
Linalool	1103	3,34
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1143	0,34
α -Ylangène	1373	0,20
α -Copaène	1376	0,57
β -Bourbonène	1386	0,35
β -Elémène	1388	0,56
trans-Caryophyllène	1419	1,82
γ -Elémène	1425	0,19
α -Cubébène	1458	0,88
α - Humulène	1455	1,17
Germacrène D	1478	1,55
α -Amorphène	1470	0,40
Bicyclosesquiphellandrène	1489	2,51
δ -Cadinène	1516	2,90
Germacrène B	1554	3,22
Oxyde de caryophyllène	1570	0,44

3.2. Activité antimicrobienne

L'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* exhibe une activité antimicrobienne contre toutes les souches testées en dépit de leur morphologie et de leur Gram (Figures 1 et 2). Les résultats montrent que la bactérie Gram négative est plus résistante que la bactérie Gram positive. En effet, *Klebsiella oxytoca* a été inhibée à partir de la concentration 2,5% (V/V), *Lactobacillus plantarum* est inhibée à partir de 0,075% (V/V). Il a été montré que les bactéries Gram+ sont plus sensibles que les bactéries Gram- [15]. L'inhibition de la levure *Sacchromyces cerevisiae* a lieu à partir de la concentration de 0,75% (V/V), sa concentration cellulaire a passé dans ce cas de $3,1 \cdot 10^7$

UFC/ml à $8,3 \cdot 10^6$ UFC/ml après 24 heures d'incubation. *Geotrichum candidum* est totalement inhibé à partir de la concentration 0,75% (V/V). L'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles peut être due à une perturbation de la structure membranaire des microorganismes [16].

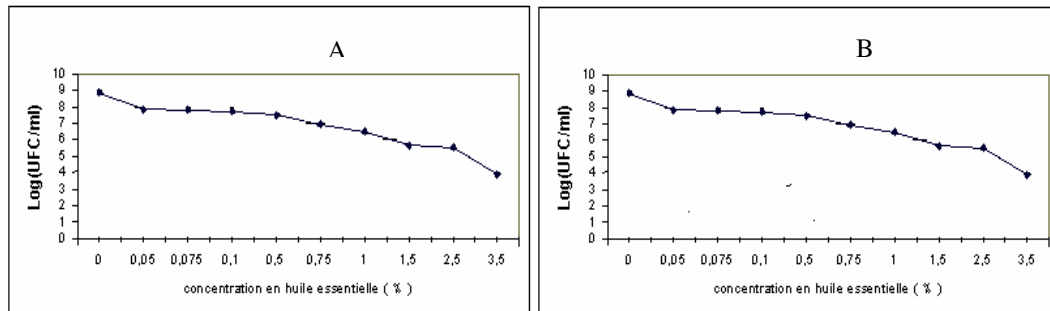


Figure 1. Effet de l'huile essentielle de *J. phoenicea* sur la croissance cellulaire de *Klebsiella oxytoca* (A) et de *Lactobacillus plantarum* (B).

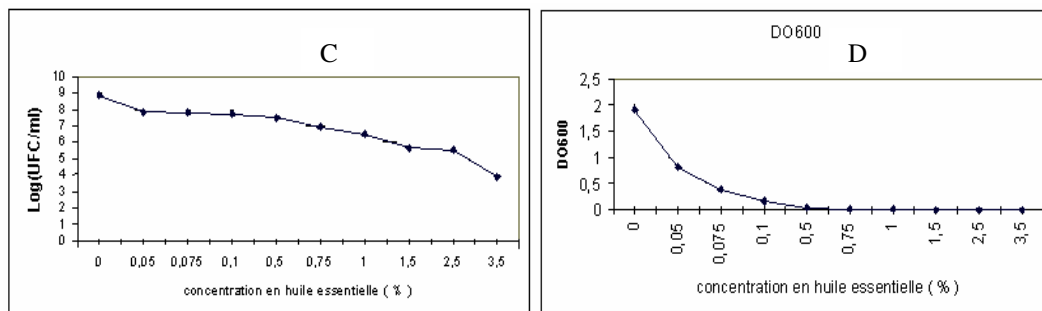


Figure 2. Effet de l'huile essentielle de *J. phoenicea* sur la croissance cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (C) et de *Geotrichum candidum* (D).

3.3. Activité antioxydante

Les Figures 3 et 4 illustrent respectivement les variations de l'indice de peroxyde du saindoux et de l'huile de soja en fonction du temps en présence de l'huile essentielle de *J. phoenicea* et la comparaison avec le δ -tocophérol. Une protection contre l'oxydation est assurée en présence de cette huile essentielle pour le saindoux et pour l'huile de soja. L'huile essentielle de *J. phoenicea* possède une activité antioxydante qui est liée à sa composition chimique. Il est difficile d'attribuer cette activité à un seul composé puisque un effet de synergie entre les différents composés peut avoir lieu.

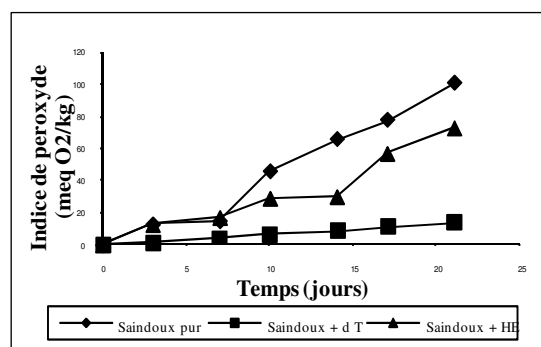


Figure 3. Variation de l'indice de peroxyde du saindoux en fonction du temps en présence d'huile essentielle de *J. phoenicea*, comparaison avec le δ -tocophérol. (d T : δ -tocophérol).

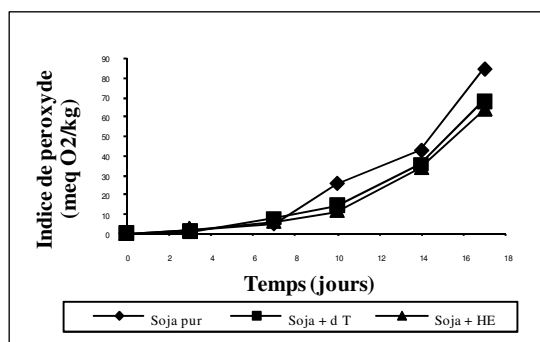


Figure 4. Variation de l'indice de peroxyde de l'huile de soja en fonction du temps en présence d'huile essentielle de *J. phoenicea*, comparaison avec le δ -tocophérol.

3.4. Activité insecticide

La Figure 5 illustre l'évolution de la consommation chez *T. confusum* adulte au cours du temps et en présence d'huile essentielle de *J. phoenicea*. L'analyse de cette Figure montre une diminution de consommation chez *T. confusum* suite à l'ingestion de grains enrobés avec l'huile essentielle à une concentration de 0,1%, ce qui prouve bien que l'huile essentielle de *J. phoenicea* contient des substances actives à effet anti-appétant. Signalons aussi que le taux de mortalité à cette concentration en huile essentielle est de 90% pour les adultes de *T. confusum*.

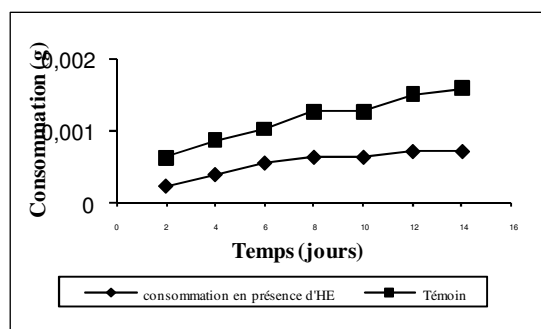


Figure 5. Evolution de la consommation chez *T. confusum* au cours du temps

4. CONCLUSION

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* a permis d'identifier 27 composés, ce qui correspond à 84,63% de la totalité de l'huile. Les composés majoritaires sont : α -pinène (59,11%) ; linalool (3,3%) ; germacrène D (1,55%) ; germacrène B (3,22%). Cette huile a manifesté une propriété antioxydante comparable à celle du δ -tocophérol à la concentration de 200 ppm, elle a permis de protéger un corps gras le saindoux et une huile végétale l'huile de soja. L'évaluation de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *J. phoenicea* a permis d'affirmer qu'elle a un pouvoir inhibiteur vis à vis de tous les microorganismes testés indépendamment de leur gram et de leur morphologie, signalons que la bactérie à gram positif est plus sensible que la bactérie à gram négatif. Concernant l'effet insecticide de cette huile essentielle le suivi au cours du temps de la consommation chez *T. confusum* adulte a montré un effet anti-appétant, la consommation de l'insecte a diminué. Un taux de mortalité de 90% de *T. confusum* à la concentration en huile essentielle de 0,1% est observé.

REMERCIEMENTS : Nous adressons nos plus vifs remerciements au professeur Mohamed Neffati (IRA Médenine) qui a contribué à ce travail en fournissant une matière végétale identifiée, provenant du Sud Tunisien.

RÉFÉRENCES

- [1] A. M. Janssen, J. J.C. Scheffer, A. Baerheim Svendsen, *Pharm. Weekbl.*, **1987**, *9*, 193.
- [2] C. March, I. Sanz, E. Primo Yufera, *Zentralbl. Mikrobiol.*, **1991**, *146*, 291.
- [3] S. G. Deans, G. Ritchie, *Int. J. Food Microbiol.*, **1987**, *5*, 165.
- [4] D. Biondi, P. Cianci, C. Geraci, G. Ruberto, *Flavour Fragr. J.*, **1993**, *8*, 331.
- [5] N. Ben Hamida-Ben Ezzedine, M. M. Abdelkefi, R. Ben Aissa, M. M. Chaabouni, *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, *13*, 295.
- [6] M. Elgayyar, F. A. Draughon, D. A. Golden, J. R. Mount, *J. Food Prot.* **2001**, *64*, 1019.
- [7] N. Bouzouita, F. Kachouri, M. Hamdi, M. M. Chaabouni, *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 380.
- [8] N. Bouzouita, F. Kachouri, M. Hamdi, M. M. Chaabouni, R. Ben Aissa, S. Zgoulli, P. Thonart, A. Carlier, M. Marlier, G.C. Lognay, *J. Essent. Oil Res.*, **2005**, *17*, 584.
- [9] C. Carson, J. Riley, *J. Appl. Bact.*, **1995**, *78*, 264.
- [10] F. Shahidi, D. K. Janitha, P. D. Wanasandura, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, **1992**, *32*, 67.
- [11] P. M. Guarrera, *J. Ethnopharmacology.*, **1999**, *68*, 183.
- [12] C. Cavaleiro, S. Rezzi, L. Salgueiro, A. Bighelli, J. Casanova, A. Proenca da Cunha, *Biochem. Systematics Ecol.*, **2001**, *29*, 1175-1183.
- [13] R. P. Adams, A. F. Barrero, A. Lara, *J. Essential Oil Res.*, **1996**, *8*, 367-371;
- [14] S. Rezzi, C. Cavaleiro, A. Bighelli, L. Salgueiro, A. Proenca da Cunha, J. Casanova, *Biochem. Systematics Ecol.*, **2001**, *29*, 179-188.
- [15] G. Pintore, M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, J. Casanova, *Flavour Fragr. J.*, **2002**, *17*, 15.
- [16] J. E. Gustafson, Y. C. Liew, S. Chew, J. Markham, H. C. Bell, S. G. Wyllie, J. R. Warmington, *Letters in applied microbiology.*, **1998**, *26*, 194.