



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**DOCTORAT EN SCIENCES**

Spécialité: Chimie Organique appliquée

Par:

**M<sup>me</sup> TABET ZATLA Amina**

Sur le thème

---

**Caractérisations chimiques et étude biologiques d'extraits de quatre plantes aromatiques " *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum cheirifolium*" de la région de Tlemccen**

---

Soutenue publiquement le 16 Novembre 2017 à Tlemccen devant le jury composé de:

M <sup>f</sup> CHOUKCHOU-BRAHAM Nouredine	Pr.	Université de Tlemccen	Président
M <sup>f</sup> DIB Mohammed El Amine	Pr.	Université de Tlemccen	Directeur de thèse
M <sup>me</sup> BENDIMERED Nassima	Pr.	Université de Tlemccen	Examinatrice
M <sup>f</sup> BOUSALEM Smain	Pr.	Centre universitaire d'Ain	Examinateur
		Témouchent	
M <sup>f</sup> BENMEHDI Houcine	MCA	Université de Béchar	Examinateur

*Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)  
BP 119, 13000 Tlemccen - Algérie*

*Uniquement à mon très cher Père qui  
de son paradis déguste la saveur des  
fruits de son vergers.*

## REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été réalisés en grande partie dans le laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives « **LASNABIO** » de la faculté des sciences, et au laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses « **COSNA** » Université de Tlemcen, sous la direction de Monsieur **DIB Mohamed El Amine**.

Un grand merci à mon encadrant Monsieur **DIB Mohamed El Amine**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir guidé constamment vers la lumière pendant ces quatre années de thèse, pour m'avoir appris à aiguiser ma rigueur scientifique et aussi pour sa qualité humaine inestimable.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le Professeur **GHALEM Saïd**, Directeur du laboratoire de Substances Naturelles et Bioactives « **LASNABIO** » pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour ses conseils pertinents durant mon travail de thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **TABTI Boufeldja**, pour ses grandes qualités humaines et pour son appui à certains moments difficiles de la réalisation de ce travail.

Je voudrais remercier Monsieur le Professeur **KAJIMA MULENGI Joseph**, Directeur du laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses « **COSNA** » pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Qu'il me soit permis de remercier vivement Monsieur le Professeur **CHOUKCHOU-BRAHAM Noureddine** de l'université de Tlemcen. Vous avez eu la gentillesse de présider le jury de cette soutenance de thèse. Je tiens à vous faire part de ma respectueuse gratitude.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur **BOUSALEM Smain** du centre universitaire d'Ain Témouchent, et Monsieur le Docteur **BENMEHDI Houcine** de l'université de Béchar, pour m'avoir honoré de leur présence en acceptant d'être les

rapporteurs de ce travail. Je suis très heureuse de bénéficier de leurs recommandations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Que Madame **BENDIMERED Nassima** Professeur à l'Université de Tlemcen, qui a accepté de participer à cette Commission d'Examen, trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail.

J'adresse également mes vifs remerciements à Monsieur le professeur **BENABADJI Noury** de Laboratoire de Botanique, Département de Biologie, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen et à Monsieur le Docteur **KAZI TANI Choukri** de l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen pour l'identification botanique des différentes espèces. Merci pour vos qualités humaines qui m'ont toujours impressionnée.

Je remercie également Monsieur le **Dr. DJABOU Nassim** pour son aide pour l'interprétation des analyses statistiques.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à Monsieur le professeur **Jean COSTA** directeur du Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, et à Monsieur **Alain MUSELLI** Maître de conférence de l'université de Corse, pour la réalisation des analyses CPG et CPG/SM.

Mes remerciements les plus profonds vont à mon **PERE**, même s'il n'est plus là car il m'a construit et m'a toujours donné l'envie de me battre, à ma **MERE**, qui m'a appris à être persévérante et qui m'a donnée la qualité d'être acharnée au travail,.

Mes remerciements s'adressent également: à mon **MARI**, pour son soutien, ses sacrifices et sa patience durant ces années, à ma fille **Malaak**, et mes fils **Mohammed Redouane** et **Younés** qui sont ma raison de vivre.

Je remercie tout particulièrement mon **FRERE**, et mes **SŒURS** qui ont toujours été soucieux de mon bien être en restant à mes côtés et tous ceux qui m'ont aidé et encouragé dans la réalisation de ce travail, même avec une bonne parole.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**AAR:** Activité Anti-oxydante Relative.

**ABS:** Absorbance

**ACP:** Analyse en Composante Principale

**AFNOR:** Association Française de Normalisation.

**BHT:** Butylhydroxytoluène

**B.:** *Ballota*

**C.:** *Cynoglossum*

**CPG:** Chromatographie en Phase Gazeuse

**CPG/SM:** Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**CHA:** Classification Hiérarchique Ascendante

**CFU:** Colony forming units

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**DPPH:** 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

**DMSO:** Diméthyl sulfoxyde

**D.:** *Daucus*

**E.T:** Ecart type

**E:** Est

**EdT-MEPS:** Espace de Tête - Micro-Extraction en Phase Solide

**FID:** Flame Ionisation Detector

**HD:** Hydrodistillation

**H.E:** Huile Essentielle

**H.Y:** Hydrolat

**IR :** Indice de rétention

**IC<sub>50</sub>:** concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres

**M.:** *Marrubium*

**MEPS:** Micro-Extraction en Phase Solide

**N:** Nord (Latitude)

**O:**Ouest (Longitude)

**P.A:** Partie aérienne

**PAM:** Plantes aromatiques et médicinales

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**PI:** Pourcentage d'inhibition

**p/p:** poids/poids

**Rdt:** Rendement

**RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire

**SM:** Spectrométrie de **m**asse

**ssp.:** Sous espèce

**v/v:** volume/volume

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure I.1:</b> Planche botanique du <i>Daucus carota ssp. sativus</i>	6
<b>Figure I.2:</b> Planche botanique et photos de <i>Marrubium vulgare</i>	8
<b>Figure I.3:</b> photo de <i>Ballota nigra</i>	10
<b>Figure I.4:</b> Photo de <i>Cynoglossum cheirifolium</i>	13
<b>Figure I.5:</b> Tomate infectées par <i>Alternaria alternata</i>	30
<b>Figure I.6:</b> Fraises infectées par <i>Botrytis cinerea</i>	32
<b>Figure II.1:</b> Montage d'hydrodistillation	36
<b>Figure II.2:</b> Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive	42
<b>Figure II.3:</b> Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'acide ascorbique	42
<b>Figure II.4:</b> Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration des huiles essentielles de <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> , (a): racine, (b): partie aérienne	43
<b>Figure II.5:</b> Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration du BHT: (a) et des huiles essentielles des parties aériennes de <i>Marrubium vulgare</i> (b)	43
<b>Figure II.6:</b> Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration du BHT (a) et des huiles essentielles des parties aériennes de <i>Cynolossum cheirifolium</i> (b)	44
<b>Figure II.7:</b> Pourcentage de réduction de DPPH• de l'huile essentielle de <i>Ballota nigra</i> et du BHT en fonction de temps	45
<b>Figure II.8:</b> Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration du BHT (a) et des huiles essentielles des parties aériennes de <i>Marrubium vulgare</i> (b)	47
<b>Figure II.9:</b> Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle de <i>Cynolossum cheirifolium</i>	47
<b>Figure II.10:</b> Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration du BHT (a) et de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>Ballota nigra</i> (b)	48
<b>Figure III.1:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'H.E Coll des racines du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i>	74
<b>Figure III.2:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'H.E Coll des parties aériennes du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i>	75
<b>Figure III.3:</b> Analyse par grappe (CA) des compositions chimiques des huiles essentielles de <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> d'Algérie (R: racine, AP: parties aériennes, S: échantillon)	80

<b>Figure III.4:</b> Analyse des principaux composés (ACP) des compositions chimiques des huiles essentielles de <i>Daucus carota. ssp. sativus</i> d'Algérie (R: racine, AP: parties aériennes, S: échantillon, C: composés de Tableau III.3)	<b>81</b>
<b>Figure III.5:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'extrait de l'hydrolat des racines du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i>	<b>89</b>
<b>Figure III.6:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'extrait de l'hydrolat des parties aériennes du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i>	<b>90</b>
<b>Figure III.7:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i>	<b>97</b>
<b>Figure III.8:</b> Variation du rendement en huile essentielle des parties aériennes de <i>Marrubium vulgare</i> au cours des trois stades végétatifs	<b>100</b>
<b>Figure III.9:</b> Pourcentage de la variation des principales classes de composés du <i>Marrubium vulgare</i> en fonction des trois stades de croissances	<b>105</b>
<b>Figure III.10:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'extrait de l'hydrolat de <i>Marrubium vulgare</i>	<b>107</b>
<b>Figure III.11:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de <i>Ballota nigra</i>	<b>110</b>
<b>Figure III.12:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'extrait de l'hydrolat de <i>Ballota nigra</i>	<b>111</b>
<b>Figure III.13:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de <i>Cynoglossum cheirifolium</i>	<b>114</b>
<b>Figure III.14:</b> Composés majoritaires identifiés dans l'extrait d'hydrolat de <i>Cynoglossum cheirifolium</i>	<b>115</b>
<b>Figure IV.1:</b> Variation de l'intensité de la couleur du DPPH en fonction de la concentration	<b>117</b>
<b>Figure IV.2:</b> Taux d'inhibition des quatre souches en fonction de la concentration de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i>	<b>125</b>
<b>Figure IV.3:</b> Effet protecteur des huiles essentielles (A) et des hydrolats (B) et effet préventif des huiles essentielles (A') et des hydrolats (B') après 15 et 20 jours de stockage respectivement à 24± 1°C, contrôles (C)	<b>131</b>
<b>Figure IV.4:</b> Contrôle négatif (a), Contrôle positif (b) et effet protecteur (c) des huiles essentielles contre les infections causées par <i>A. alternata</i>	<b>133</b>



- Figure IV.5:** Effet de prévention et de protection de l'huile essentielle (a) et de l'hydrolat (b) durant sept jours de stockage à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , contrôles (c) **136**
- Figure IV.6:** Effet de prévention (a) et effet de protection (b) des huiles essentielles et de l'hydrolat des racines sur les infections causées par *B. cinerea* **136**
- Figure IV.7:** Effet de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* sur les différents stades larvaires de *Tuta. absoluta* **139**

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.1:</b> Liste des 4 plantes aromatiques sélectionnées	<b>5</b>
<b>Tableau III.1:</b> Coordonnées géographiques et rendements des huiles essentielles relatives aux stations de récolte de <i>Daucus. carota</i> ssp. <i>sativus</i> d'Algérie	<b>72</b>
<b>Tableau III.2:</b> Variabilité chimique des huiles essentielles de <i>Daucus. carota</i> ssp. <i>sativus</i> d'Algérie	<b>77</b>
<b>Tableau III.3:</b> Les composés majoritaire des huiles essentielles de <i>Daucus. carota</i> provenant de différentes origines rapportées dans la littérature	<b>85</b>
<b>Tableau III.4:</b> Compositions chimiques des extraits d'hydrolat des racines et des parties aériennes du <i>Daucus. carota. ssp. sativus</i>	<b>92</b>
<b>Tableau III.5:</b> Composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes du <i>Marrubium vulgare</i>	<b>96</b>
<b>Tableau III.6:</b> Compositions chimiques des huiles essentielles du <i>Marrubium vulgare</i> au cours des trois stades de développement	<b>102</b>
<b>Tableau III.7:</b> Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat du <i>Marrubium vulgare</i>	<b>106</b>
<b>Tableau III.8:</b> Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes du <i>Ballota nigra</i>	<b>109</b>
<b>Tableau III.9:</b> Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat du <i>Ballota nigra</i>	<b>111</b>
<b>Tableau III.10:</b> Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes du <i>Cynoglossum cheirifolium</i>	<b>113</b>
<b>Tableau III.11:</b> Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat du <i>Cynoglossum cheirifolium</i>	<b>115</b>
<b>Tableau IV.1:</b> Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle du <i>Marrubium vulgare</i> et du BHT à différentes concentrations	<b>118</b>
<b>Tableau IV.2:</b> Activité anti-oxydante de l'huile essentielle <i>Marrubium vulgare</i> et de BHT par la méthode de dosage du $\beta$ -carotène/ acide linoléique à différentes concentrations	<b>119</b>
<b>Tableau IV.3:</b> Les paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction de l'huiles essentielle de <i>Ballota nigra</i>	<b>120</b>
<b>Tableau IV.4:</b> Activité anti-oxydante de l'huile essentielle <i>Ballota nigra</i> et de BHT par la méthode de dosage du $\beta$ -carotène/ acide linoléique à différentes concentrations	<b>121</b>
<b>Tableau IV.5:</b> % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle du <i>Daucus. sativus</i> et de l'acide ascorbique à différentes concentrations	<b>122</b>

<b>Tableau IV.6:</b> IC <sub>50</sub> de l'huile essentielle mesurée par les méthodes d'inhibition de DPPH et β-carotène/acide linoléique	<b>123</b>
<b>Tableau IV.7:</b> Effet de l'huile essentielle du <i>Marrubium vulgare</i> sur la germination des spores des microorganismes testés	<b>125</b>
<b>Tableau IV.8:</b> Activité antifongique des huiles essentielles contre les souches phytopathogènes	<b>127</b>
<b>Tableau IV.9:</b> Effet protecteur des huiles essentielles extraites des quatre plantes sur l'infection causée par <i>A. alternata</i> des tomates	<b>129</b>
<b>Tableau IV.10:</b> Effet de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat sur la germination des spores des microorganismes testés	<b>135</b>
<b>Tableau IV.11:</b> Effet de l'huile essentielle et de l'hydrolat sur les scores sensoriels d'acceptabilité des fruits de fraises stockés à 25 ± 1°C	<b>137</b>
<b>Tableau IV.12:</b> Activité larvicide de l'huile essentielle du <i>Marrubium vulgare</i> contre <i>Tuta absoluta</i>	<b>138</b>

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
I. Cadre général.....	1
II. Problématique de recherche.....	2
<b>CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>4</b>
I. Plantes aromatiques et médicinales PAM.....	4
I.1. Définitions des substances naturelles.....	4
I.2. Composition chimique des plantes aromatiques.....	4
II. Etude botaniques, structurales et culturelles des quatre plantes étudiées. ....	6
II.1. <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> .....	6
II.1.1. Description botanique.....	7
II.1.2. Utilisations en médecine traditionnelle.....	7
II.1.3. Etude bibliographique.....	8
II.2. <i>Marrubium vulgare</i> .....	8
II.2.1. Description botanique.....	9
II.2.2. Utilisations en médecine traditionnelle.....	9
II.2.3. Propriétés physicochimiques et biologiques.....	9
II.2.4. Etude bibliographique.....	9
II.3. <i>Ballota nigra</i> .....	10
II.3.1. Description botanique.....	11
II.3.2. Utilisations en médecine traditionnelle.....	11
II.3.3. Propriétés physicochimiques et biologiques.....	11
II.3.4. Composition chimique de la ballote.....	12
II.3.5. Etude bibliographique.....	12
II.4. <i>Cynoglossum cheirifolium</i> .....	13
II.4.1. Description botanique.....	13
II.4.2. Utilisations en médecine traditionnelle.....	14
II.4.3. Etude bibliographique.....	14
III. Les huiles essentielles, produits d'extraction des PAM.....	14
III.1. Historique.....	14
III.2. Définition.....	15
III.3. Les facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles ....	16
III.3.1. Facteurs de variabilité d'ordre naturel.....	17

III.3.1.1. Facteurs Intrinsèques: <i>les facteurs génétiques, la localisation, le degré de maturité</i> .....	17
III.3.1.2. Facteurs Extrinsèques: <i>le sol, le climat, l'environnement</i> .....	18
III.3.2. Facteurs d'origine technologique.....	18
III.4. Les activités biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles.....	18
III.4.1. Activités biologiques.....	19
III.4.2. Activités pharmacologiques.....	19
III.4.3. Activité antifongique.....	21
III.4.4. Activité anti-oxydante.....	22
III.4.5. Activité antibactérienne.....	23
III.4.6. Activité insecticide.....	23
III.5. La toxicité des huiles essentielles.....	23
IV. Les hydrolats.....	24
IV.1. Considérations générales.....	24
IV.2. Composition des hydrolats.....	25
IV.3. Activités biologiques et pharmacologiques.....	26
IV.3.1. Activité antifongique.....	27
IV.3.2. Activité pharmacologique.....	27
IV.3.3. Conclusion.....	28
V. Valorisation des huiles essentielles et des hydrolats.....	28
V.1. Application aux fruits de la tomate.....	29
V.1.1. Les maladies et les bioagresseurs de la tomate.....	29
V.1.2. Huiles essentielles et hydrolats moyen de lutte contre les maladies et les bio-agresseurs de la tomate.....	31
V.2. Application aux fruits des fraisiers.....	32
V.2.1. Les maladies de la fraise.....	32
V.2.2. Huiles essentielles et hydrolats moyen de lutte contre les maladies de fruits des fraisiers.....	32
<b>CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>34</b>
I. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> .....	34
I.1. Extraction des huiles essentielles.....	34
I.2. Fractionnement des huiles essentielles.....	34

I.3. Identification et quantification des composants.....	34
I.4. Provenance du matériel végétal et identification.....	34
II. Provenance du matériel végétal et identification du <i>Marrubium vulgare</i> .....	35
III. Provenance du matériel végétal et identification de <i>Ballota nigra</i> .....	35
IV. Provenance du matériel végétal et identification du <i>Cynoglossum cheirifolium</i> .....	35
V. Extraction des huiles essentielles et des hydrolats .....	36
VI. Les méthodes d'identification des huiles essentielles.....	37
VI.1. Analyse par CPG/FID.....	37
VI.2. Couplage CPG/Spectrométrie de masse.....	37
VI.3. Méthodologie d'analyse.....	37
VII. Calcul du rendement.....	39
VIII. Etudes statistiques.....	39
IX. Évaluation de l'activité anti-oxydante .....	39
IX.1. Piégeage du radical DPPH'.....	40
IX.1.1. Principe.....	40
IX.1.2. Droites d'étalonnage des échantillons.....	42
X.2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	46
X.2.1. Principe .....	46
X.2.2. Droites d'étalonnage des échantillons.....	47
XI. Évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'hydrolat des racines de <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> sur le fruit de fraise.....	48
XI.1. Isolement des agents pathogènes.....	48
XI.2. Activité antifongique <i>in vitro</i> .....	48
XI.3. Calcul de pourcentage d'inhibition.....	49
XI.4. Activité antifongique <i>in vivo</i> .....	49
XII. Activité antifongique des huiles essentielles de <i>Marrubium. vulgare</i> , <i>Daucus. carota ssp sativus</i> , <i>Cynoglossum cheirifolium</i> et <i>Ballota nigra</i> et de leurs hydrolats sur le fruit de tomate.....	50
XII.1. Isolement des agents pathogènes.....	51
XII. 2. Activité antifongique <i>in vitro</i> .....	51
XII.3. Activité antifongique <i>in vivo</i> .....	51
XIII. Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> contre <i>Tuta. absoluta</i> .....	53

Références bibliographiques.....	54
<b>CHAPITRE III: EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLE</b>	<b>72</b>
I. Introduction.....	72
II. Huiles essentielles et extraits des hydrolats de <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> .....	72
II.1. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> .	72
II.1.1. Rendements des huiles essentielles.....	73
II.1.2. Composition chimique des huiles essentielles.....	73
II.1.3. Variabilité chimique inter-stations des huiles essentielles de <i>D. carota ssp. sativus</i>	76
II.1.4. Discussions.....	82
II.2. Compositions chimiques de l'extrait d'hydrolat des racines et de la partie aérienne du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> .....	88
III. Composition chimique des huiles essentielles et de l'extrait d'hydrolat de <i>Marrubium vulgare</i> .....	95
III.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> .....	95
III.2. Effet du cycle végétatif sur le rendement et la composition de l'huile essentielle.....	99
III.2.1. Caractérisation chimique.....	99
III.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle durant le cycle végétatif.....	101
III.3. Composition chimique de l'extrait d'hydrolat de <i>Marrubium vulgare</i>	105
IV. Huiles essentielles et extrait de l'hydrolat de <i>Ballota nigra</i> .....	107
IV.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ballota nigra</i> .....	108
IV.2. Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat de <i>Ballota nigra</i> .....	110
V. Huiles essentielles du <i>Cynoglossum cheirifolium</i> .....	112
V.1. Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Cynoglossum cheirifolium</i> .....	112
V.2. Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat du <i>Cynoglossum cheirifolium</i> .....	114
<b>CHAPITRE IV: ACTIVITE BIOLOGIQUE</b> .....	<b>116</b>
I. Introduction.....	116
II. Activités anti-oxydantes des huiles essentielles.....	117
II.1. Activité anti-oxydante du <i>Marrubium vulgare</i> .....	117
II.1.1. Le piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup> .....	117
II.1. 2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	118
II.2. Activité anti-oxydante de <i>Ballota nigra</i> .....	119

II.2.1. Le piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup> .....	119
II.2.2. Test de blanchissement du β-carotène.....	120
II.3. Activité anti-oxydante de <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> par piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup> .....	121
II.4. Activité anti-oxydante du <i>Cynoglossum cheirifolium</i> .....	122
II.4.1. Le piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup> .....	122
II.4.2. Test de blanchissement du β-carotène.....	123
III. Activité antifongique .....	123
III.1. Activité antifongique <i>in vitro</i> des huiles essentielles.....	124
III.1.1. Activité antifongique <i>in vitro</i> de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> sur quelques souches fongique (olivier et tomates) .....	124
III.1.2. Activité antifongique <i>in vitro</i> des huiles essentielles extraite des quatre plantes sur les souches infectant les tomates.....	125
III.2. Effet des huiles essentielles et des hydrolats sur l'inhibition de décroissance fongique <i>in vivo</i> de la tomate.....	127
III.3. Activité antifongique du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> sur le fruit des fraisières.....	134
III.3.1. Activité <i>in vitro</i> sur les souches fongiques responsables de la pourriture des fraises. ....	134
III.3.2. Effet de l'huile essentielle et de l'hydrolat des racines du <i>Daucus. carota ssp. sativus</i> sur l'inhibition de décroissance fongique <i>in vivo</i> sur la fraise .....	135
III.3.3. Evaluation de la consommation des fraises stockées (Test de goût).....	137
IV. Activité insecticide de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> .....	137
V. Discussions.....	139
Références bibliographiques.....	143
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>153</b>



# *Introduction Générale*

### I. Cadre général

Les maladies de conservation des fruits constituent un obstacle majeur au développement des productions biologiques de fruits, elles se traduisent régulièrement par des pertes allant de 40 à 50% de la récolte [1].

Afin de lutter contre ces contaminations fongiques, des méthodes de contrôle chimiques ont été exercées. Cependant, les utilisations des fongicides synthétiques présentent des inconvénients importants en raison de l'augmentation de leurs coûts, et de leurs menace pour la santé humaine et l'environnement [2,3]. De même, la persistance de ces résidus toxiques sur les fruits et légumes après traitement et le développement des souches résistantes, à ces composés, présentent la limite de leur emploi [4]. D'où la recherche de nouvelles méthodes de conservation efficaces, naturelles et sans danger pour la santé.

Les huiles essentielles sont des produits de grande valeur ajoutée utilisées dans divers domaines tels que la parfumerie, l'agro-alimentaire, la pharmacie et l'aromathérapie, ce sont des substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants, elles ont été suggérées comme sources alternatives très importante pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires, et pour éviter les pertes post-récoltes des fruits pendant le stockage [5]. L'hydrolat qui est un sous-produit qui se forme lors du processus d'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation, à partir de l'eau ayant servi à l'entraînement des composés volatils. Contient en faible quantité des molécules odorantes de la plante ainsi que des composés plus polaires non retrouvés dans l'huile essentielle. Les hydrolats sont considérés la plupart du temps comme un déchet de l'hydrodistillation. Pourtant, certains hydrolats de plantes possèdent des propriétés biologiques et organoleptiques, ils ont été utilisés dans les industries alimentaires et cosmétiques. Selon certains auteurs, ils sont également utilisés dans l'agriculture biologique contre les champignons, la moisissure et les insectes et pour la fertilisation des sols [6]. Malgré cela, la communauté scientifique ne s'y intéresse que très peu. La composition chimique et les propriétés biologiques des hydrolats constituent donc un sujet de recherche qui reste à explorer.

Actuellement, la recherche s'oriente vers l'utilisation des huiles essentielles qui sont des composés volatils capables de libérer des substances actives dans l'espace libre, comme un moyen de base dans le domaine de l'emballage des fruits [5]. Cependant, la lutte biologique est devenue une solution alternative aux produits chimiques par l'utilisation des substances naturelles anti-oxydantes et antifongiques. Parmi ces substances naturelles figurent les huiles essentielles et les hydrolats extraits des plantes aromatiques.

C'est dans cette optique que notre travail s'inscrit et se base sur une étude continue visant le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles et des hydrolats dans le domaine agro-alimentaire. Cela débute dans un premier temps par une séquence analytique permettant la caractérisation chimique des huiles essentielles et des extraits d'hydrolats des parties aériennes et des racines de quatre plantes de la région de Tlemcen, et d'évaluer dans un deuxième temps leurs activités anti-oxydantes et antifongiques, *in vitro* contre *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata* qui affectent les tomates et évaluer par la suite leurs activités *in vivo* contre *A. Alternata*.

De même, l'huile essentielle et l'hydrolat du *Daucus. carota ssp sativus* ont été testés *in vitro* contre trois champignons : *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. L'activité *in vivo* contre *B. cinerea* aussi a été réalisée. Cette étude de l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles et des hydrolats met en valeur deux axes principaux:

- **Effet préventif** des huiles par l'étude de leur effet antifongique. .
- **Effet protecteur** des huiles par l'étude de leur capacité à protéger les fruits testés.

## II. Problématique de recherche

La richesse de la flore Algérienne n'est plus à démontrer, elle est représentée par 4125 plantes répartie en 123 espèces botaniques [7]. De plus, l'Ouest Algérien, plus précisément la région de Tlemcen possède une flore abondante, riche, peu valorisée d'un point de vue de leur potentiel chimique et biologique et variée dans laquelle il a été dénombré de nombreuses espèces aromatiques, susceptibles de fournir des huiles essentielles.

L'objectif principal de cette étude est de contribuer au développement de la filière des plantes aromatiques comme ingrédients de lutte biologique contre divers pathologies.

Dans ce travail de thèse, deux grands volets ont été développés:

- Un volet chimique, qui consiste à la caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles et des extraits des hydrolats des quatre plantes de l'Ouest Algérien, il s'agit de *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra*, *Cynoglossum cheirifolium*.
- Un volet complémentaire biologique basé sur la mise en évidence des activités anti-oxydantes, antifongiques et insecticides des huiles essentielles et des extraits des hydrolats des plantes étudiées.

Ce manuscrit, se subdivise en quatre chapitres:

Le **premier chapitre** est une synthèse bibliographique consacré aux huiles essentielles (HEs), et les hydrolats ainsi qu'à leurs activités biologiques.

## Introduction générale

---

Dans le **second chapitre**, nous détaillerons le matériel, les méthodes employées et nous décrirons les moyens d'analyses et de caractérisation des huiles essentielles et des extraits d'hydrolats.

Le **troisième chapitre** présentera une synthèse des principaux résultats obtenus sur l'analyse des huiles essentielles et des hydrolats.

Le **quatrième chapitre** sera consacré à l'étude biologique qui met en évidence la valorisation des huiles essentielles et des hydrolats des quatre plantes étudiées pour leurs activités antifongiques, anti-oxydantes, et insecticides.

# *Chapitre I: Synthèse bibliographique*

*Ce chapitre présente une synthèse bibliographique permettant de définir les différents termes abordés dans ce sujet. Ce chapitre se compose de trois parties.*

*Dans une première partie, nous définirons les plantes aromatiques et leur propriétés.*

*Nous présenterons une étude bibliographique des plantes étudiées.*

*Ensuite, un aperçu des connaissances concernant les huiles essentielles et les hydrolats.*

*Enfin, les activités biologiques des huiles et des hydrolats et leur valeurs ajoutés destinés au secteurs agroalimentaire comme agent antifongique et insecticide naturel.*

### **I. Plantes aromatiques et médicinales PAM**

#### **I.1. Définitions des substances naturelles**

Les PAM contiennent des molécules à haute valeur ajoutée, parmi lesquelles on trouve des composés ayant une activité olfactive. Ils représentent ce que l'on appelle huile essentielle HE et sont très convoités par les industries pharmaceutiques et cosmétiques [8,9].

Connue aussi sous le nom d'essence, une huile essentielle est un ensemble de molécules volatiles extraites de plantes aromatiques par distillation sèche, par expression, par incision de la plante [10]. Il s'agit d'un ensemble de molécules aromatiques d'origine naturelles qui sont utilisées par l'aromathérapie pour leurs effets bénéfiques sur la santé. L'aromathérapie est l'art de préserver la santé avec les huiles essentielles. Elle fait recours à une méthodologie rigoureuse qui s'inspire de données scientifiques solides confirmées tant par l'expérimentation clinique que par les recherches en laboratoire [11].

#### **I.2. Composition chimique des plantes aromatiques**

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe et constituée de deux fractions. La première fraction dite volatile (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle.





Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires comme celles qui génère l'obtention des molécules très volatiles formées à partir du motif isoprénique où les réactions d'addition de ces unités qui conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes et les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques produit de leurs oxydation. Tous ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique [12].

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes [13], composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante [14].

Une étude bibliographique générale a été effectuée sur les plantes aromatiques, suite à la volonté de travailler sur le plus grand nombre possible de plantes pendant la thèse, nous avons pu choisir 4 plantes aromatiques de la région de Tlemcen (**Tableau I.1**) en suivant les critères de sélection suivants: (I) les plantes peu étudiées jusqu'à présent et (II) la valorisation des huiles essentielles et des hydrolats de ces plantes dans le domaine agro-alimentaire n'est pas étudier.

## Chapitre I: Synthèse bibliographique

Tableau I.1: Liste des 4 plantes aromatiques sélectionnées

Nom Latin	Caractéristiques organoleptiques	Images
<i>Daucus. carota ssp. sativus</i>	Racines: une odeur forte, agréable et aromatique	
<i>Marrubium vulgare</i>	Feuilles: odeur de thym	
<i>Ballota nigra</i>	Feuilles: odeur nauséabonde rappelant le moisi	
<i>Cynoglossum cheirifolium</i>	Feuilles: une odeur désagréable, une odeur de souris	

## **II. Etude botaniques, structurales et culturelles des quatre plantes étudiées**

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux. L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabes, chinoises, égyptiennes, hindous, grecques, romaines [15,16]. Dans les dernières décennies il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde [17,18].

L'enquête ethnobotanique s'est avérée une des approches la plus fiable pour la découverte de nouveaux médicaments. Ainsi le maprouneacin (*Maprounea africana*) utilisé comme agent antidiabétique, le taxol (*Breviflora taxus*) utilisé comme drogue antitumorale, l'artémisinine (*Artemisia annua*) utilisé comme composé antipaludique efficace contre toutes les souches résistantes de *Plasmodium* ont été découverts à partir de plantes et sont directement employés [19].

L'Algérie, est l'un des pays méditerranéens qui a une longue tradition médicinale et un savoir-faire traditionnel à base des plantes médicinales, vue sa situation géographique, il possède une végétation riche et variée dans laquelle il existe de nombreuses plantes aromatiques qui suscitent de grands intérêts ces dernières années.

La richesse de la flore Algérienne et sa diversité, ainsi que l'endémisme important qui la caractérise (soit 600 espèces, sous espèces et variétés, ce qui représente près de 20% de la flore vasculaire), donne à la droguerie Algérienne une empreinte territoriale et un particularisme élevé spécialement en plantes médicinales [20].

### **II.1. *Daucus. carota ssp. sativus***



**Figure I.1:** Planche botanique du *Daucus. carota ssp. sativus*



**Famille:** Apiaceae (Apiacées)

**Sous-famille:** Apioideae

**Genre:** *Daucus*

**Espèce:** *D. carota*

**Sous-espèce:** *D. carota* subs. *sativus*

**Tribu:** Scandiceae

**Sous-tribu:** Daucinae

**Variété:** *D. carota* var. *sativus*

**Nom vernaculaire:** Zaroudia

### II.1.1. Description botanique

Le mot carotte définit le plus souvent une forme longue et pointue à la fin, ou un tube allongé. La *carotte* est une plante ombellifère de l'espèce *Daucus carota*. Les carottes sont des apiacées, connues pour la carotte potagère de la sous-espèce *sativus*, une légumineuse. En alimentation, la racine rougeâtre du légume est savoureuse et pas trop fibreuse, contrairement à la carotte sauvage. C'est une plante bisannuelle riche en carotène dont la racine est un tubercule d'hypocotyle.

La carotte forme une rosette de feuilles au printemps et en été, tout en développant l'épaisse racine en forme de navet allongé, laquelle stocke de grandes quantités de sucre pour la floraison de l'année suivante. La tige florale pousse d'environ 10 cm avec une ombelle de fleurs blanches au sommet [21]. La racine est comestible, généralement orange, blanche ou une combinaison de rouge et blanc, et même-plus rarement, violette avec un intérieur blanchâtre: toutes ces variétés ont une texture croquante quand elles sont fraîches [22,23]. La floraison de la carotte sauvage se repère facilement sur les bords de chemin; les ombelles de fleurs sont très mellifères et attirent de nombreux insectes.

### II.1.2. Utilisations en médecine traditionnelle

la carotte aide à nettoyer les dents car ce légume-racine stimule la sécrétion de salive, ce qui contribue aussi indirectement à une bonne digestion.

En dehors des antioxydants, carotène et vitamines qu'elle renferme, la carotte a longtemps bénéficié d'une légendaire efficacité sur la vue humaine. La racine émolliente (adoucit) particulièrement les irritations des voies digestives estomac, duodénum, foie mais aussi résolutive, diurétique, vermifuge, antiseptique. Dans les affections du foie. Il a donné aussi de bons résultats pour la toux des enfants.

Les semences de carotte sont aussi utilisées dans les problèmes de coliques néphrétiques, elles permettent d'évacuer les calculs [24].

### II.1.3. Etude bibliographique

Les compositions chimiques de l'huile essentielle de *Daucus. carota ssp. sativus* a fait l'objet de plusieurs études. Les principaux constituants de l'huile essentielle de *Daucus. carota ssp. sativus* de Pologne [25][22], d'Iran [26][23], et de Suède [27][24] étaient:  $\alpha$ -pinène, sabinène, (E)- $\beta$ -caryophyllène, trans-anéthol, carotol, myrcène, (E)- $\beta$ -ocimène et le méthyle iso Eugenol.

### II.2. *Marrubium vulgare*



**Figure I.2:** Planche botanique et photos de *Marrubium vulgare*

**Règne:** Végétal  
**Classe:** Magnoliopsida  
**Ordre:** Lamiales  
**Famille:** Lamiaceae  
**Genre:** *Marrubium*  
**Espèce:** *M. vulgare*  
**Nom binomial:** *M. vulgare*  
**Nom vernaculaire:** Merrioua

### II.2.1. Description botanique

*M. vulgare* L. Le Marrube blanc ou Marrube Commun (*Marrubium vulgare*) est une plante herbacée du genre *Marrubium*, de la famille des Lamiacées. Son odeur de thym la distingue d'autres plantes. C'est une plante pérenne de couleur grisonnante ressemblant légèrement à la menthe, et qui peut atteindre 25 à 45 cm de hauteur. Ses feuilles duveteuses ont une longueur de 2 à 5 cm et un aspect froissé, vert jaunâtre à la face supérieure et vert blanchâtre à la face inférieure, possédant un bord crénelé et dentelé. Les fleurs sont blanches et comme beaucoup d'autres Lamiacées, le Marrube a une tige carrée.

### II.2.2. Utilisations en médecine traditionnelle

Le Marrube blanc fut traditionnellement employé dans la fabrication des remèdes contre la toux. Antonius Castor le connaissait et Pline l'Ancien indique de nombreuses préparations curatives utilisant le marrube [28]. Ses sommités pouvaient être un des multiples constituants de la thériaque de la pharmacopée maritime occidentale au XVIII<sup>e</sup> siècle [29].

Il est utilisé aussi dans l'inappétence, troubles dyspeptiques tels que les flatulences et ballonnements, inflammations des voies respiratoires.

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique, diurétique et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité [30]. Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmés par des essais scientifiques [31], le marrube blanc est considéré comme antidiabétique [32].

### II.2.3. Propriétés physicochimiques et biologiques

La partie aérienne du marrube blanc contient plusieurs métabolites secondaires tels que les diterpènes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques de *Marrubium vulgare* [33], les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) [34], ainsi que plusieurs phénylpropanoïdes esters tels que les verbascosides [35].

### II.2.4. Etude bibliographique

La composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* a fait l'objet de nombreuses publications. La littérature révèle l'apparition de plusieurs chimiotypes. De Lituanie, le (Z)- $\beta$ -farnesène, le  $\beta$ -caryophyllène, (E)-2-hexenal, l' $\alpha$ -humulène et le germacrène D étaient les principaux constituants de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* [36]. De la République tchèque, les principaux constituants de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*

étaient le  $\beta$ -caryophyllène (45,8%) et le germacrène D (14,4%) [37]. Dans l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* de différentes régions de l'Iran, les principaux constituants sont, le  $\beta$ -bisabolène (25,4%), le  $\beta$ -caryophyllène (11,6%), le germacrène D (9,7%) et le E-  $\beta$ -farnésène (8,3%) [38], le  $\beta$ -bisabolène (20,4%),  $\delta$ -cadinène (19,1%) et l'isocaryophyllène (14,1%) [39] et l'oxyde de caryophyllène (18,7%), le  $\beta$ -caryophyllène (12,8%) et le germacrène D (10,0%) [40]. Dans celle de l'Egypte, les principaux constituants étaient le tricyclène, le  $\beta$ -pinène, le bisabolol, l' $\beta$ -élémore et l'isomenthon-8-thiol [41]. Dans l'huile de *Marrubium vulgare* de différentes régions de Tunisie, les principaux constituants de *Marrubium vulgare* étaient le  $\gamma$ -eudesmol (11,93%),  $\beta$ -citronellol (9,90%), citronellyl formate (9,50%) et germacrène D (9,37%) [42], le  $\beta$ -bisabolène (28,3%), le (E)- $\beta$ -farnésène (7,4%), le  $\beta$ -caryophyllène (7,8%) et 1,8-cineol (4,8%) [43] et dans l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* de différentes régions de l'Algérie, les principaux constituants étaient le 4,8,12,16-tétraméthyl heptadécane-4-olide (16,97%), le germacrène D-4-ol (9,61%), l' $\alpha$ -pinène (9,37%), phytol (4,87%), hydro-sabina cétone (4,12%), piperitone (3,27%),  $\delta$ -cadinène (3,13%), 1-octène-3-ol (2,35%) et benzaldéhyde (2,31%) [44], de l'eugénol (16%) et de la  $\beta$ -bisabolène (11%) [45].

### II.3. *Ballota nigra*



Figure I.3: photo de *Ballota nigra*

**Règne:** Plantae  
**Classe:** Magnoliopsida  
**Ordre:** Lamiales

**Famille:** Lamiaceae

**Genre:** *Ballota*

**Espèce:** *Ballota nigra*

**Nom binomial:** *Ballota nigra*

**Nom vernaculaire:** Feracioun açoued

### II.3.1. Description botanique

La Ballote ou Ballote noire (*Ballota nigra*) fait partie de la famille des Lamiacées. La Ballote est une plante herbacée, vivace, à croissance rapide et de 30 à 85 cm de haut. Les tiges, tétragones et velues, sont ramifiées près de leur base et portent des feuilles opposées, tomenteuses [46], d'un vert sombre légèrement grisé et à pétiole court. Elles ne dépassent pas 5 cm de long et 3,5 cm de large. Le limbe est ovale ou arrondi, à bords irrégulièrement crénelés et présente une nervation marquée au niveau de la face inférieure [47,48]. Froissée, il émane de la plante une forte odeur nauséabonde rappelant le moisi; sa saveur est âcre et amer [46].

### II.3.2. Utilisations en médecine traditionnelle

Traditionnellement, la Ballote était utilisée comme vermifuge, antiémétique, sédatif, astringent doux, et stimulant. Elle était également employée pour diminuer le vomissement, et au début du XVII<sup>ème</sup> siècle, pour soigner des troubles nerveux tels que la dyspepsie ou des troubles du sommeil en réduisant la nervosité. C'est au début de ce siècle que H. LECLERC l'emploie avec réussite comme antispasmodique, pour soulager les crampes et maux d'estomacs, et dans le traitement de différents états de perturbations psychique, particulièrement contre l'anxiété [47].

En phytothérapie, on utilise les sommités fleuries qui sont récoltées au moment de la floraison. Les premiers travaux chimiques et pharmacologiques ont été accomplis dans les années 30 par J. BALANSARD [47].

À la dose recommandée, aucun effet indésirable n'est à signaler, néanmoins, certains auteurs recommandent de l'utiliser prudemment ou sur une courte durée car elle contient des diterpènes labdanniques [47]. Enfin, elle est déconseillée chez la femme enceinte en raison de son ancienne utilisation en tant qu'emménagogue [47].

### II.3.3. Propriétés physicochimiques et biologiques

Cette plante présente des propriétés anxiolytiques et antidépressives, c'est pourquoi elle permet de lutter contre la nervosité, l'anxiété, les angoisses, la dépression ainsi que les troubles nerveux notamment chez les femmes au moment de la ménopause. Elle possède

aussi des attributs contre les spasmes digestifs et les quintes de toux (antispasmodique) [46].

La Ballote constitue également un sédatif et un cholérétique.

Les dérivés phénylpropaniques qu'elle contient ont un effet antioxydant, et un nombre d'entre eux se lient, avec plus ou moins d'affinité, aux récepteurs de la dopamine, de la morphine et des benzodiazépines [47], par conséquent et puisqu'elle est dénuée de toxicité, il est possible d'employer la Ballote comme alternative aux benzodiazépines. On peut l'utiliser chez les enfants et, pour une synergie d'action, la Ballote peut être associée au magnésium.

### II.3.4. Composition chimique de la ballote

La ballote contient de la marrubine, substance à l'origine des lactones diterpéniques, des glycosides phénylpropanoïdes, des acides-phénols ainsi que d'une huile essentielle, substance concentrée fétide utilisée en homéopathie [47].

### II.3.5. Etude bibliographique

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ballota nigra* a fait l'objet de quelques études. L'huile essentielle de *Ballota nigra* de Kurdia est caractérisée par la présence majoritaire de l'oxyde de caryophyllène (39,43%), le trans-caryophyllène (24,88%), le germacrène D (7,64%), le 1-undécène (4,20%), l'époxyde d'isoaromadendrène (3,25%), et le tridécane-1 (2,81%) [49].

Dans *Ballota nigra* du nord de l'Iran, les principales composantes de l'huile essentielle étaient l'oxyde de caryophyllène (7,9%), l'épi-muurolol (6,6%),  $\delta$ -cadinène (6,5%) et  $\alpha$ -cadinol (6,3%) [50]. Dans *Ballota nigra ssp. Foetida*, caryophyllène (25,1%) et germacrène D (24,2%) étaient les composés principaux [51]. Dans *Ballota nigra ssp. Anatolique*, les principaux composants étaient le germacrène D (18,1%), l'acétate de nérolidol-époxy (15,4%), l'oxyde de sclaréol (12,1%), l'acétate de linalyle (11,5%) et le caryophyllène (10,5%) [52].

#### II.4. *Cynoglossum cheirifolium*



**Figure I.4:** Photo de *Cynoglossum cheirifolium*

**Règne:** Plantae

**Division:** Magnoliophyta

**Classe:** Magnoliopsida

**Ordre:** Lamiales

**Famille:** Boraginaceae

**Genre:** *Cynoglossum* (*Pardoglossum*)

**Espèce:** *Cynoglossum cheirifolium* (*Pardoglossum cheirifolium*)

**Nom vernaculaire:** Oudnin el Djediane

##### II.4.1. Description botanique

La cynoglosse à feuilles de giroflée (*Pardoglossum cheirifolium*) est une plante méditerranéenne spectaculaire par son abondant feuillage argenté. Comme la cynoglosse officinale ou la bourrache officinale, elle fait partie de la famille des Boraginacées, plantes herbacées généralement très velues, à inflorescence en cymes unipares scorpioïdes.

C'est une plante bisannuelle plutôt basse (40 cm maximum) poussant dans les prairies sèches, les terrains vagues ou les garrigues (sol calcaire). L'ensemble de la plante est recouvert de poils blancs, notamment les feuilles aux poils feutrés sur les deux faces, qui ressemblent par leur forme à celles de la giroflée, d'où le nom donné à la plante. Petit calice (5 mm environ) à poils rudes et à 5 lobes. Corolle pourpre foncé puis bleuissant soudée en tube à 5 lobes. 5 étamines. Ovaire supère donnant 4 nucules recouvertes de crochets leur permettant de s'accrocher au poil des animaux [53].

### II.4.2. Utilisations en médecine traditionnelle

D'après la population de la région, l'utilisation médicinale traditionnelle de la *Cynoglossum cheirifolium* est pour: l'acné, diarrhée, blessures, l'ulcère de l'estomac. Cette plante est utilisée par voie orale sous forme de tisane par infusion de ses feuilles ou externe [54].

### II.4.3. Etude bibliographique

Des travaux effectués sur la partie aérienne de *cynoglossum cheirifolium* ont montré la présence des acides gras. Ces derniers ont été obtenus par extraction et identifiés par la chromatographie en phase gazeuse.

-Le rendement d'huile d'acides gras: 9.19%.

-Le composé majoritaire: acide linoléique(ALA) 18:3w3 [55].

## III. Les huiles essentielles, produits d'extraction des PAM

### III.1. Historique

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles à son alimentation, à son hygiène et à sa santé.

Depuis le temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques.

Déjà, en Chine, l'Empereur Chen Nong (2800 av J-C), médecin érudit, consigne son savoir relatif aux plantes médicinales dans un livre, le Pen Ts'ao, qui recense plus de 1000 plantes médicinales utiles [56].

Il semblerait que ce soit les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel.

Plus tard la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'Art de distillation.

C'est Gerber (721-815) qui mentionna le premier de façon écrite la description de la distillation.

L'alambic est incontestablement associé à Avicenne (930-1037), tout comme le Giovannil-Baptista Della Porta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage "De destillatione" parut en 1567, mentionne les connaissances avancées des Arabes dans le domaine de la distillation.

Parmi les premiers chercheurs qui ont décrit les huiles essentielles de point de vue chimique [57], Hermann Boerhave (1668-1738).



Ce n'est qu'au XX<sup>ème</sup> siècle que les scientifiques commencent à s'intéresser au domaine de l'aromathérapie qui est devenue par la suite une source importante.

En 1928, René-Maurice Gatte Fossé chimiste Français publie un ouvrage "aromathérapie" décrivant la relation entre la structure biochimique de l'huile essentielle et son activité antimicrobienne.

En 1929, Sevelinge un pharmacien en France, étudia les huiles essentielles en médecine vétérinaire et confirma le potentiel antimicrobien élevé de ces substances aromatiques.

En 1975, Franchomme en France, aromatalogue mis en évidence l'importance du chémotype (ou race chimique de l'espèce) [58].

L'ère industriel a pris peu le pas sur un empirisme et développa ainsi de nouvelles techniques de distillation.

En compte actuellement 3000 huiles essentielles, parmi ces dernières 300 sont commercialisées dans l'industrie des arômes et de cosmétique.

L'orientation des travaux de recherche vers une nouvelle stratégie d'utilisation des biomolécules issues de substances végétales été pour la simple raison d'avoir une alimentation plus naturelle et saine pour les consommateurs. Toute fois, depuis les cinquante dernières années plusieurs études ont montré des utilisations massives des huiles essentielles dans différents domaines [59].

### **III.2. Définition**

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle.

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatils et odorants appelés également substances organiques aromatiques liquides, obtenus par entraînement à la vapeur d'eau de plantes aromatiques ou d'organe de cette plante (fleur, feuille, bois, racine, écorce, fruit,...), elles sont volatils et sensibles à l'effet de la chaleur [60].

Selon la 8<sup>ème</sup> éditions de la pharmacopée française (en 1965), les huiles essentielles, essences ou huiles volatils sont des produits d'une composition généralement assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux dont ils sont plus ou moins modifiés au cours de leurs préparations [61].

La norme AFNOR T75-006 (février 1998) [62], définit l'huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, ou bien par distillation sèche [61].

La majorité des huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante. Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique, en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes.

Ce sont des molécules légères qui sont entraînées par la vapeur d'eau lors de la distillation, l'huile se sépare de l'eau du distillat mais une petite partie persiste dans l'eau et lui communique une odeur, on parle alors d'eau aromatique, à rapprocher de l'hydrolat, eau distillée aromatisée (parfois artificiellement) à laquelle on ajoute parfois de l'alcool, des stabilisants chimiques ou des conservateurs. L'utilisation des plantes aromatiques, les huiles essentielles par l'humanité est très ancienne et assez universelle; ils s'en servent traditionnellement pour conjurer le mauvais sort, se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture, conserver les aliments.

Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains en utilisant les huiles essentielles des plantes.

Les huiles essentielles vont servir de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement (rôle écologique): attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive sur les prédateurs, inhibition de la germination des graines, voire communication entre les végétaux (émission de signaux chimiques signalant la présence d'animaux herbivores par exemple). Ces huiles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, poils sécréteurs (comme dans la menthe), canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif: protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores [63]. La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 0,1 à 2%, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15%. Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les Lamiacées (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic etc..), les Astéracées (camomille, absinthe...), les Myrtacées (Cannelle, Laurier...), les Apiacées (coriandre...).

### **III.3. Les facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles**

La composition chimique et le rendement des huiles essentielles sont influencés par diverses conditions: le génotype, l'environnement, la composition des sols, le lieu et la période de récolte, la température et la durée de séchage [64-67].

### III.3.1. Facteurs de variabilité d'ordre naturel

Il existe deux types de facteurs de variabilité d'ordre naturel, les facteurs intrinsèques dépendant des caractéristiques génétiques de la plante et les facteurs extrinsèques liés aux conditions de développement de la plante [68].

#### III.3.1.1. Facteurs Intrinsèques: *les facteurs génétiques, la localisation, le degré de maturité*

##### *a- Chémotypes Génétique*

Le premier paramètre influençant la composition chimique d'une plante est sa biosynthèse et donc son profil génétique. C'est la raison pour laquelle, une même espèce peut présenter plusieurs chémotypes de profils chimiques différents (polymorphisme chimique).

Les chémotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques, on compte pour *Thymus vulgaris*, espèce morphologiquement homogène, sept chémotypes différents [61], [69], dont les essences sont à dominance géraniol, linalool,  $\gamma$ -terpinéol, carvacrol, thymol, trans-thuyanol, terpin-1-èn-4-o1 ou myrcénol.

De même cette allotropie chimique est présente aussi pour d'autres espèces, exemple: la fenchone, terpène, proche du camphre, s'accumule dans l'huile essentielle de fenouil amer, alors que le fenouil doux offre deux chémotypes différents: l'un à anéthole, l'autre à estragole, sans pour autant que des caractères morphologiques différenciés puissent être décelés [70].

Il a été constaté donc que non seulement les activités et même des toxicités variables des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront des différences significatives [71].

##### *b- Selon l'organe*

Le potentiel et la composition de l'huile essentielle dépend de l'organe. Par exemple les parties fleuries de la sauge, ont une huile essentielle plus riche en certains terpènes que les feuilles [72].

##### *c- Au cours du cycle végétatif*

Beaucoup de travaux ont fait l'objet des études de variabilité chimique en fonction du cycle végétatif [73-75].

En effet, Il a été montré que même l'heure et la période de la récolte de la plante sont des facteurs influençant [76].

### III.3.1.2. Facteurs Extrinsèques: le sol, le climat, l'environnement

Plusieurs facteurs externes peuvent influencer également la composition chimique de l'huile essentielle telle que la température, le taux d'humidité, le climat, la pluviométrie et les conditions édaphiques (composition du sol), représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique de l'huile essentielle [77-81].

Selon Fluck [82], les facteurs écologiques prépondérants sont le climat et le sol. Chez la *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du *mentho furanne* [80].

Il a été montré que les *Citrus* ont une proportion plus importante en huile essentielle quand on augmente la température [80]. De même les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* donnent un meilleur rendement en huile essentielle sous l'effet de fertilisants [83].

Pour la même espèce, le même génotype et le même stade de développement, les facteurs extrinsèques peuvent engendrer des modifications quantitatives et qualitatives importantes pour les huiles essentielles. Ceci a été confirmé par un certains nombres de travaux [84,85].

### III.3.2. Facteurs d'origine technologique

Des modifications très importantes de l'huile essentielle peuvent être illustrées lors des études des végétaux, du début c'est à dire leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle [86].

Le mode de récolte, les conditions de séchage et de stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques.

Il est à noter que les changements les plus importants auront lieu pendant l'étape de l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, comme le pH, la température et la durée d'extraction [68].

D'autres facteurs influencent le rendement et la qualité de l'huile essentielle comme les traitements de la matière végétale avant ou pendant l'hydrodistillation: broyage, dégradation chimique ou enzymatique et la pression [68].

### III.4. Les activités biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été mise en place dans plusieurs domaines, l'aromathérapie, la pharmacie, la parfumerie, la cosmétique et la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leur large spectre d'activités biologiques [87-92].

### III.4.1. Activités biologiques

Une grande variété de plantes aromatiques comme l'origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont utilisées comme additif alimentaires. Leurs huiles essentielles ont la même spécificité, c'est la présence des composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol qui possèdent une forte activité antibactérienne.

Le carvacrol qui ne présente aucune toxicité, est utilisé comme conservateur et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations.

Le thymol principe actif des rince-bouches et l'eugénol utilisé aussi dans les produits cosmétiques, alimentaires, et dentaires.

Une équipe de chercheurs ont montré aussi que ces composés ont donné une bonne activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus illussake*, *Staphylococcus aureus* et *Helico bacterpyroli* [93,94]. D'autres familles de composés comme les alcools, les aldéhydes et les cétones monoterpéniques (géraniol, linalool, menthol, terpinéol, thujanol, myrcénol, citronellal, néral, thujone, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes ( $\gamma$ -terpinène, p-cymène) présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes [95].

Dans ce contexte beaucoup de chercheurs à travers le monde, étudient leurs utilisations en tant qu'agent de conservation puisqu'ils ont des propriétés très intéressantes comme aromatisants naturelles dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [95].

La majorité de ces composés sont de très bons fongicides. Parmi eux le thymol, le carvacrol, et l'eugénol qui ont été testé vis à vis d'une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et d'autres [96,97].

### III.4.2. Activités pharmacologiques

Actuellement l'aromathérapie constitue dans certains cas une alternative aux traitements proposés en médecine conventionnelle. Elle permet également de limiter l'emploi de médicaments ou de renforcer leur action en s'y associant. L'aromathérapie est de plus en plus utilisée car il y a une prise de conscience des individus. Ils souhaitent limiter l'usage des médicaments et avoir recours « au naturel ».

Certaines huiles essentielles sont toxiques et doivent être utilisées à des doses spécifiques et avec des précautions. Les huiles essentielles présentent une forte affinité pour le tissu nerveux de par leur solubilité dans les lipides d'où un risque de neurotoxicité plus ou moins important

selon les huiles essentielles. Elles sont parfois toxiques pour un organe (foie, rein, etc.) ou sont photo sensibilisantes ou bien agressives pour la peau et les muqueuses, etc. L'utilisateur ou le prescripteur doit être vigilant, particulièrement pour les sujets à risques ou fragilisés (nourrisson, jeunes enfants, femmes enceintes ou allaitantes, sujets allergiques, sujets épileptiques, personnes âgées, etc.)

Il est important de préciser que la médecine conventionnelle (allopathie) et les médecines non conventionnelles (aromathérapie, phytothérapie, gemmothérapie, nutrithérapie, ostéopathie, etc.) ne se concurrencent pas. Elles sont complémentaires et permettent d'explorer les différents moyens de maintenir ou d'améliorer l'état de santé de chaque individu.

Les huiles essentielles seront utilisées pour lutter contre les maladies mais également pour le maintien de l'équilibre de l'organisme, voici quelques exemples:

- L'huile essentielle de lemon-grass inhibe le développement du mycélium d'un champignon responsable d'aspergillose, altère le contenu cellulaire et perfore les membranes de ce germe. Elle est efficace par fumigation ou par contact. Elle permet d'éviter des contaminations fongiques aériennes, alimentaires, humaines et autres.. [98].
- L'impact de la diffusion atmosphérique de l'huile essentielle de lavande fine et d'essence d'oranger doux est évalué sur des patients de cabinets dentaires. Deux cents personnes (hommes et femmes) sont observées. Une comparaison est faite avec l'impact de la musique sur le comportement. L'anxiété et le stress sont réduits de façon significative par l'impact olfactif de cette huile essentielle [99].
- La perception du stress durant douze heures est minorée lors de l'utilisation de l'huile essentielle de lavande fine en application cutanée [100].
- La diffusion de l'huile essentielle de lavande fine présente une activité similaire au diazépam (molécule anxiolytique). elle aide à la gestion du stress, à appréhender un travail difficile, un environnement néfaste (bruit, etc.), une douleur, une intervention chirurgicale [101].
- L'huile essentielle de menthe poivrée réduit la sévérité des nausées post-opératoires [102].
- La diffusion atmosphérique d'huile essentielle de lavande fine et d'huile essentielle d'encens calme le stress et l'angoisse.
- Elles se substituent à un traitement allopathique lors de troubles bénins.
- L'huile essentielle de gaulthérie couchée ou l'huile essentielle d'eucalyptus citronné calme l'inflammation lors de douleurs articulaires, etc.

Parmi beaucoup d'autres activités, les propriétés anti-infectieuses et relaxantes des huiles essentielles sont bien validées et très souvent utilisées.

Les huiles essentielles sont principalement utilisées pour leurs propriétés citées ci-dessous [102] :

- **Activité anti-infectieuse:** cette propriété est validée pour de nombreuses huiles essentielles. Elles détruisent des bactéries, des virus et des champignons.
- **Activité antiparasitaire, insectifuge, insecticide:** certaines huiles essentielles détruisent des parasites (poux, puces, agents responsables de la gale, etc.), éloignent et détruisent des insectes (nombreux moustiques).
- **Activité neurotrophe:** les huiles essentielles agissent au niveau du système nerveux. Elles présentent une action calmante ou stimulante.
- **Activité anti-inflammatoire:** les huiles essentielles calment des inflammations localisées au niveau d'articulations, de tendons, de nerfs, de muscles, de la peau, des muqueuses, etc.
- **Activité antihistaminique:** les huiles essentielles inhibent des réactions allergiques.
- **Activité spasmolytique:** les huiles essentielles permettent de stopper des contractions musculaires (muscles striés et muscles lisses).
- **Activité vasculaire et lymphatique.**
- **Les huiles essentielles réduisent un œdème, stoppent un saignement, résorbent un hématome.**
- **Activité respiratoire:** les huiles essentielles décongestionnent les voies respiratoires. Elles accélèrent l'élimination du mucus et fluidifient les sécrétions
- **Activité gastro-intestinale, digestive, hépatique, anti-nauséuse:** les huiles essentielles stimulent la digestion et stoppent les nausées.
- **Activité cutanée:** les huiles essentielles favorisent la cicatrisation, la régénération du tissu cutané
- **Activité cosmétique:** les huiles essentielles luttent contre le vieillissement cutané. Elles sont anti-radicalaires et favorisent la régénération du tissu cutané.
- **Aromatisation:** à condition de les utiliser à très faible dose (moins de 0,05% en général), les huiles essentielles peuvent parfumer des aliments.

### **III.4.3. Activité antifongique**

Les moisissures sont avant tout connues pour leurs effets d'altération des denrées alimentaires, par exemple les fruits. Dans la chaîne alimentaire, les moisissures assurent le rôle de décomposeurs naturels. La plupart des moisissures sont hétérotrophes, c'est-à-dire que

ces organismes fondent leur développement sur l'assimilation de composés organiques produits par d'autres espèces. Afin d'assurer une protection contre ces champignons, les huiles essentielles sont utilisées comme source alternative de protection naturelle dans le secteur agro-alimentaire [103].

La plupart des travaux réalisés dans ce domaine concerne les huiles essentielles des plantes appartenant à la famille des Lamiacées: celles de thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... D'après les résultats obtenue, les phénols tels que l'eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol ont la plus intéressante activité antifongique a comparés avec les aldéhydes testés: cinnamique et hydro cinnamique. A l'inverse, les groupements méthoxy sont sans effet fongistatique. Cette activité est suivie par simple observation macroscopique.

Il s'est avéré que l'activité antifongique diminue selon le type de fonction chimique: Phénols>Alcools>Aldéhydes>Cétones>Ethers>Hydrocarbures. Parmi eux le cinnamaldéhyde qui est un aldéhyde aliphatique et qui est le plus actif. Concernant les composés phénoliques, l'activité antifongique croît avec l'encombrement stérique de la molécule p-n-propylphénol> thymol> isoeugénol> eugénol [104]. Le pouvoir antifongique augmente après addition d'un groupement alkyls au noyau benzène du phénol.

### **III.4.4. Activité anti-oxydante**

Les huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour rehausser le goût des aliments [105-108], et la conservation grâce aux effets antioxydants de certains de leurs constituants surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir [95], [109-111].

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles est également attribuée à d'autres constituants autres que les composés phénoliques comme certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes [112,113-118].

Ces agents naturels viennent réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques qui présentent des effets néfastes sur la santé [119-122]. En effet, l'utilisation des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxytoluènebutilé (BHT), ainsi que l'hydroxyanisolebutilé (BHA) est suspectée à long terme d'effets mutagènes et cancérigènes [95] [123,124].

Une équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'utilisation directe des huiles essentielles sur les aliments comme la viandes hachées, les légumes hachés, la purée de fruit, yaourts... où la vaporisation



sur la surface de l'aliment: viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...les protègent des phénomènes d'oxydation [95].

### III.4.5. Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a fait l'objet de plusieurs travaux, il a été constaté que cette activité n'est pas attribuée à un mécanisme unique mais à différents sites d'action au niveau cellulaire et ceci est due à leur composition [125].

En générale, le mode d'action des huiles essentielles dépend des caractéristiques hydrophobes des composants actifs des huiles, qui leur donnent la particularité de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne ainsi provoqué un changement de la membrane [126,127].

De même la synthèse de l'ADN, ARN des protéines et des polysaccharides est aussi inhiber par les huiles essentielles [128].

### III.4.6. Activité insecticide

Les substances d'origine végétale, en particulier les huiles essentielles, sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyens de défense contre les ravageurs phytophages [129]. Les biopesticides à base d'huiles essentielles présentent plusieurs caractéristiques d'intérêt [130].

Les huiles essentielles ont fait l'objet de nombreuses recherches en vue de réduire les pertes occasionnées par les insectes ravageurs des grains stockés par leur effet insecticide [131-136]. L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps, en effet le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes [137]. Dans des travaux encore plus récents, les propriétés insecticides de certaines plantes ont été testées sur les larves d'insectes.

Les effets insecticides des plantes ont été prouvés par de nombreux auteurs. On peut citer l'extrait aqueux de *Azadirachta indica* A. Juss contre *Heliothis armigera* (Hubner) et *Plutellaxyl ostella* (Curtis) [138], l'extrait de *Cestrum parqui* sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*. Forskal [139]. Les huiles essentielles du genévrier, du faux poivrier et de l'armoise sur *Ryzoperta dominica* L. [140], les extraits de *Melia azedarach* A. Juss., de *Nerium oleander* L., et de *Inula viscosa* (L.) W. Greuter sur le criquet pèlerin [141].

### III.5. La toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées de milliers de composants connus à la fois par leurs efficacités, mais en même temps elles sont aussi très dangereuses. Certains composants aromatiques peuvent être dangereux et toxique. La toxicité des huiles essentielles particulièrement de leurs constituants tels que les cétones mono terpéniques est connue depuis ces derniers siècles [142].

L'automédication est favorisée par le fait qu'un grand nombre de ces produits sont distribués en dehors du secteur pharmaceutique ce qui est dangereux; par contre, la législation réserve la distribution de certains d'entre eux aux pharmaciens en garantissant ainsi un contrôle rigoureux d'identité et de conformité.

Egalement les huiles essentielles des plantes aromatique de la famille des Lamiacées celles du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic etc..; peuvent se révéler dangereuses lorsqu'elles sont ingérées à de forte doses. Les intoxications décrites dans la littérature sont généralement causées par un usage incontrôlé. Les symptômes de ce type d'intoxication sont marqués par des crises de convulsions de type épileptique, parfois accompagnée de cyanose et interrompue par des phases hypotoniques et hyporéflexique. Elle peut aussi causée une perte de conscience [143].

Le caractère lipophile de ces huiles essentielles fait que même leurs utilisations par voie orale que par voie rectale ou par voie transcutanée est aussi toxique, par exemple des préparations pour des bains. Le menthol également n'est pas sans danger la dose mortelle pour l'homme est estimée à 2g et même leurs administration pour instillation nasale ou d'autre produits à base de menthol utilisées pour les petits enfants peuvent déclencher un spasme létale de la glotte [144]. Concernant la lavande elle présente une faible toxicité chez l'animal autour des 5g/kg [61].

#### **IV. Les hydrolats**

##### **IV.1. Considérations générales**

A l'issue de la distillation à la vapeur d'eau des différentes parties de plantes aromatiques, on obtient de l'huile essentielle dense en principes actifs (non hydrosolubles) au-dessus dans le vase florentin, et la vapeur d'eau redevenue liquide après refroidissement se concentre en bas. Cette vapeur d'eau redevenue liquide est chargée de composés aromatiques de l'huile essentielle environ 2 à 3 %, et d'autres principes actifs hydrosolubles que l'on ne retrouve pas dans l'huile essentielle, ce qui lui confère des propriétés propres [145].

C'est donc l'eau utilisée pour la distillation de plantes aromatiques qui se sépare de l'huile essentielle à la sortie de l'alambic que l'on appelle hydrolat, eau florale **ou hydrosol en anglais**.

Il est important de noter que chaque goutte d'hydrolat contient toutes les informations de la plante, et que l'hydrolat est plus riche en principes actifs volatils que l'infusé de la même plante. L'hydrolat a un parfum et un goût plus ou moins prononcé mais beaucoup moins concentré qu'une huile essentielle. Certaines eaux florales sont d'usage courant en cuisine et en soins externes, comme l'eau de fleurs d'oranger, l'eau de rose et l'eau de bleuet.

Les hydrolats sont extrêmement sensibles aux développements des bactéries à cause de leur faible teneur en huile essentielle et à la présence de particules végétales, raisons pour lesquelles, ils ne se conservent pas longtemps, (de 12 à 24 mois). Il faut donc impérativement les conserver à l'abri de la lumière dans des flacons opaques, à l'abri de la chaleur, et à l'abri des variations de température [145].

Certaines plantes ou fleurs ne donnent pas ou très peu d'huile essentielle, elles sont distillées surtout pour leur hydrolat aux propriétés cosmétiques et médicinales comme la mauve, le bleuet, le tilleul, l'hamamélis... Alors que les huiles essentielles sont largement étudiées, les hydrolats restent bien souvent peu exploités. Ces "eaux magiques" ont pourtant, elles aussi, des vertus thérapeutiques [146]. La thérapie par les eaux florales, l'hydrolathérapie, est une branche de l'aromathérapie.

Malgré sa faible concentration en principes actifs, l'hydrolat présente donc certaines activités pharmacologiques intéressantes. Certains sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires mais leur intérêt principal, c'est qu'ils sont toujours beaucoup mieux tolérés que les huiles essentielles [147].

### **IV.2. Composition des hydrolats**

En règle générale, les hydrolats sont riches en composés oxygénés hydrophiles alors que les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont la plupart du temps absents. On y trouve souvent de petits acides organiques volatils, ce qui implique que les hydrolats sont habituellement à pH acide.

La composition de l'hydrolat est différente de celle de l'huile essentielle: il contient une infime portion des composants de l'huile essentielle et surtout tous les composés hydrosolubles de la plante (qui ne se retrouvent pas ou peu dans l'huile essentielle) [148].

Un hydrolat d'une plante donné n'aura donc pas nécessairement les mêmes propriétés que les huiles essentielles. Par exemple l'hydrolat de Cannelle contient en dissolution 92% d'aldéhyde cinnamique, l'huile essentielle n'en contient que 75-76%.

L'hydrolat de thym renferme 46% de phénols (surtout du carvacrol) alors que l'huile essentielle n'en contient que 32% [149]. L'un et l'autre sont donc souvent complémentaires. Mais l'intérêt principal des hydrolats sur le plan thérapeutique, c'est qu'ils sont beaucoup mieux tolérés que les huiles essentielles (par les enfants et les animaux en particulier).

A cet égard Aazza et al. [150], présentent la liste des équipes de chercheurs qui ont étudié l'un de ces sujets, [151-154]. L'équipe de Inouye, a travaillé aussi dans le domaine des hydrolats, elle s'est basée sur une étude comparative importante réalisée sur 44 hydrolats et leurs huiles essentielles respectives [155].

Par ailleurs, cette étude a montré que le composé majoritaire dans l'huile essentielle n'est pas systématiquement celui qui est présent dans l'hydrolat. C'est le cas par exemple de *Eucalyptus citriodora* dont le composé majoritaire dans l'huile essentielle est le citronellal alors que dans l'hydrolat c'est le cis-p-menthane-3,8-diol qui présente la concentration majoritaire.

Cependant, pour pouvoir analyser la composition chimique des hydrolats par CPG-SM, il faut procéder à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique tel que l'éther diéthylique ou chloroforme afin de concentrer l'hydrolat avant l'injection.

### IV.3. Activités biologiques et pharmacologiques

Les études concernant l'activité biologique des hydrolats ne sont pas nombreuses en comparaison avec celles des huiles essentielles. Malgré la similitude chimique entre les hydrolats et les huiles essentielles correspondantes, Carlini et al. (1983) ont montré que l'effet psychopharmacologique de l'hydrolat obtenu des graines de *Licaria puchury-major* n'a aucune relation avec celui l'huile essentielle correspondante [156].

Souza et al. ont mis en évidence l'activité biologique de l'huile essentielle et l'hydrolat du bois et des branches de *Anibaduckei* sur les larves de *Artemia franciscana*. L'huile essentielle avec une concentration de 2 mg/ml et l'hydrolat à 25% entraînent les deux un pourcentage de mortalité de 100%. D'après les auteurs la présence du linalool à 0.09% dans ce dernier est responsable de cette activité biologique [157].

L'huile essentielle et l'hydrolat de *Satureja hortensis* plante sauvage de Turquie à différentes concentrations ont inhibée la croissance de *Alternaria mali* et *Botrytis cinerea*. Ces résultats sont convaincants avec 10% d'hydrolat sur *B. cinerea* et 15% sur *A. mali*.

Des chercheurs de l'Université de Selcuk en Turquie [158] ont évalué les activités antifongiques *in vitro* des hydrolats de cinq épices (romarin, cumin, sarriette, échinophore et basilic) contre des souches de champignons phytopathogènes (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria citri*), l'hydrolat de sarriette (*Satureja hortensis*) a donné la meilleure activité antifongique, suivi de l'hydrolat d'échinophore (*Echinophora nuiifolia*) puis de cumin (*Cuminum cyminum*).

L'activité antibactérienne des hydrolats de *Pimpinella anisum*, *Cuminum cyminum*, *Satureja hortensis*, *Thymbra spicata* et *Origanum vulgare* sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* et d'autres bactéries ont été mise en évidence par [153,154].

Vue que ces études présentent des résultats très prometteurs concernant le potentiel pharmacologique de ces types d'extraits, ceci ouvrent des perspectives très intéressantes dans le secteur agro-alimentaire, pharmaceutique, et cosmétique, avec le remplacement des conservateurs chimiques par les hydrolats. En effet, des études ont prouvé que des additifs synthétiques transforment certains produits ingérés en substances toxiques et cancérigènes [159]. Ce risque pourrait être réduit en utilisant les hydrolats comme antibactériens qui est une ressource naturelle issue de plantes aromatiques, et qui ne présente aucun danger pour la santé. Les consommateurs se méfiant actuellement des additifs chimiques il existe la possibilité d'utiliser les hydrolats de thym et d'origan serait intéressante pour la préservation des denrées alimentaires [153, 160].

### IV.3.1. Activité antifongique

Les activités antifongiques des hydrolats de cinq épices (romarin, cumin, sarriette, échinophore et basilic) ont été évalués *in vitro* sur des espèces de champignons phytopathogènes (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum f. sp. tulipae*, *Botrytis cinerea* et *Alternaria citri*) par des chercheurs de l'Université de Selcuk en Turquie [154]. L'hydrolat de sarriette (*Satureja hortensis*) a montré l'activité antifongique la plus intéressante sur l'ensemble des champignons testés suivi de l'hydrolat d'échinophore (*Echinophora nuiifolia*) puis de cumin (*Cuminum cyminum*). Dans une seconde étude, ces chercheurs se sont penchés plus précisément sur l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons pathogènes (*Alternaria mali Roberts* et *Botrytis cinerea*) en présence de l'huile essentielle et de l'hydrolat de sarriette [154].

Étonnamment, l'hydrolat inhibait beaucoup plus fortement la prolifération comparativement à l'huile essentielle. Cela montre bien l'originalité des hydrolats par rapport aux huiles essentielles. Comme précédemment, cette étude suggère que ces hydrolats pourraient être

exploités dans certains secteurs comme l'agro-alimentaire, la cosmétique et comme agents antifongiques naturels.

### IV.3.2. Activité pharmacologique

Le Docteur Suleyman Aydin de la faculté de médecine de l'Université d'Eskisehir en Turquie est l'un des premiers chercheurs à travailler sur l'activité pharmacologique de l'hydrolat d'origan (*Origanum onites* L) et son activité sur le système gastro-intestinal est l'une des premières réalisée dans ce domaine [159].

### IV.3.3. Conclusion

Les hydrolats sont largement utilisés actuellement en aromathérapie en compléments d'une thérapie par les huiles essentielles. Les hydrolats contiennent une faible quantité en principes actifs automatiquement une faible toxicité par rapport à huiles essentielles, malgré cela ils présentent certaines activités pharmacologiques et biologiques intéressantes.

Malgré ces avantages les chercheurs s'intéressent peu aux hydrolats et à leurs activités thérapeutiques. Il existe peu de travaux dans ce domaine.

Suzanne Catty, aromathérapeute qui a travaillé dans le domaine de « l'hydrolathérapie », a publié, une liste d'hydrolats et leurs propriétés thérapeutiques dans son livre paru en 2001 «*Hydrosols, The Next Aromatherapy*» [161].

## V. Valorisation des huiles essentielles et des hydrolats

Au cours des dernières années, les préférences des consommateurs se tournent vers des aliments qui contiennent des niveaux inférieurs de conservateurs chimiques et présentent des caractéristiques plus fraîches et naturelles.

Le problème alimentaire est le plus urgent, le plus permanent et le plus contraignant que toutes les sociétés ont à résoudre. Le stockage et ses modalités, sont un élément déterminant des stratégies possibles, et l'un de ceux sur lesquels le milieu physique fait peser les contraintes les plus lourdes.

En effet ce problème est actuellement pris en considérations par des études sur le développement de nouvelles méthodes telles-que l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles et des hydrolats dans le domaine alimentaire. Les huiles essentielles et leurs composants sont connus pour posséder des activités anti-oxydantes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaire, ou approuvés comme additifs alimentaires [95]. Ainsi,

les huiles essentielles et même les hydrolats ont beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives.

L'hydrolat est un sous-produit de l'huile essentielle obtenu lors de l'hydrodistillation de la matière végétale. Il s'agit d'un mélange complexe de composés hydrosolubles, contenant des traces d'huile essentielle. On utilise les hydrolats, appelés eau aromatique ou florale dans les préparations cosmétiques et les boissons. L'attention a été attirée par leur impact sur la croissance des bactéries par O. Sagdic et al, et sur la croissance des champignons par et A. Aydin et al [153,158]. Ces dernières années, des recherches ont été menées sur le sujet de plantes aromatique de différentes espèces, variétés et hybrides ainsi que leur activité antibactérienne [93,94] et antifongique [96,97]. L'efficacité des huiles essentielles contre les microorganismes a été prouvée. Par contre, il n'y a pas des travaux dans la littérature disponible faisant référence à l'activité antifongique de l'huile essentielle des quatre plantes étudiées et de leurs hydrolats.

### V.1. Application aux fruits de la tomate

Les pertes post-récoltes sont généralement attribuées à une dégradation pathologique due à des champignons, des infections bactériennes, des moustiques et des lésions physiopathologiques pendant le stockage en raison de lésions physiques, telles que des dommages mécaniques [162].

#### V.1.1. Les maladies et les bioagresseurs de la tomate

La culture de la tomate a plusieurs ennemis qui provoquent des pertes plus ou moins importantes selon les saisons et les conditions de culture. Les maladies peuvent anéantir les récoltes en absence de lutte efficace. Les ennemis sont nombreux et d'origines diverses:

- Les facteurs abiotiques (non parasitaires): ce sont des facteurs non infectieux et non transmissibles d'une plante altérée à une plante saine. Ils peuvent être d'origine climatique (froid, insolation, fortes précipitations, vents...etc.) ou d'origine édaphique (carences en éléments, excès, déséquilibres ioniques...etc.) [163].

- Les facteurs biotiques: sont nombreux et d'origines variées; ce sont essentiellement les mauvaises herbes, les maladies parasitaires, les bactérioses, les maladies cryptogamiques ou mycoses (**champignons aériens**):

- *Alternaria alternata* (pourritures noires des fruits)
- *Alternaria tomato* (pourritures noires des fruits)
- *Alternaria tomatophila* (alternariose)

- *Alternaria alternata* f. sp. lycopersici (chancre à *Alternaria*)
- *Botryos porium* spp. (moisissures saprophytes)
- *Botrytis cinerea* (moisissure grise)
- *Coryne sporacas silicola* (coryne sporiose)
- *Didymellaly copersici* (pied noir, chancres)
- *Dipodascus geotrichum* (*Geotrichum candidum*) (pourriture aigre)
- *Leveillulat aurica* (oïdium interne)
- *Passalora fulva* (cladosporiose)
- *Penicillium* sp. (moisissure saprophyte)
- *Penicillium* spp. (pourritures des fruits)
- *Pseudo cercospora fuliginea* (cercosporiose)
- *Pseudoidium neolycopersici* (oïdium externe)
- *Phytophthora infestans* (mildiou aérien)
- *Rhizopus stolonifer* (pourriture des fruits)
- *Septorialy copersici* (setoriose)
- *Stemphylium* spp. (stemphyliose)
- *Trichothecium roseum* (pourriture rose)

### et les insectes ravageurs:

- Aleurodes
- Cochenilles
- Mouche des fruits
- Mouches mineuses
- Papillons de nuit (noctuelles)
- Pucerons
- Punaises
- *Tuta absoluta*





**Figure I.5:** Tomate infectées par *Alternaria alternata*

Ces maladies peuvent occasionner des dégâts pouvant atteindre 90 % des fruits dans certaines serres.

### **V.1.2. Huiles essentielles et hydrolats comme un moyen de lutte contre les maladies et les bioagresseurs de la tomate**

Pour protéger les tomates de ces maladies et agents pathogènes, les méthodes de contrôle chimiques ont été exercées. Cependant, les utilisations de ces produits chimiques présentent des inconvénients.

D'autre part, les moustiques et les champignons ont développé une résistance contre les insecticides et les fongicides, respectivement, en raison de l'utilisation extensive et indiscriminée de ces divers groupes chimiques qui sont les outils de base pour la gestion des populations de moustiques et les infections microbiennes.

Les huiles essentielles des plantes ont été suggérées comme sources alternatives pour la conservation des aliments, la lutte contre les insectes ainsi que dans les industries pharmaceutiques [164].

Les hydrolats sont l'une des deux substances résultant de la distillation à la vapeur d'eau des plantes aromatiques. La concentration des hydrolats est très faible (0,1 à 2% en moyenne) et ils contiennent un nombre de molécules aromatiques très inférieur à celui d'une huile essentielle. Cependant, Ils sont considérés comme un recours précieux à chaque fois que l'utilisation des huiles des essentielles se révèle délicate.

Les terpénoïdes sont des composants majeurs des huiles essentielles végétales. Ils constituent principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes et sont supposés être responsables de nombreuses activités biologiques telles que les activités antifongiques, antimicrobiennes et herbicides [165,166].

Certaines huiles essentielles ont été jugées très efficaces contre les agents pathogènes résistants aux fongicides [167-169].

Par exemple, l'application de vapeur d'huile essentielle de *Cicutavi rosa* a donné les pourcentages les plus faibles d'infection dans les tomates cerises inoculées par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata* comparativement au témoin non traité. Des résultats similaires publiés par le même auteur [170], de l'effet de l'huile essentielle de graines d'*Anethum graveolens* sur les tomates cerises inoculées par les mêmes champignons.

L'activité insecticide des monoterpènes a été testée contre différents parasites de la culture agricole avec un effet potentiel fumigant, répulsif et antifeedant [171,172].

Si des études de valorisation des huiles essentielles ont été réalisées pour traiter différentes infections fongiques. Le but de notre travail de thèse est de rechercher l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles et celle des hydrolats des quatre plantes étudiés; ainsi que l'activité insecticide du *Marrubium vulgare* contre le ravageur de la tomate *Tuta absoluta*, c'est l'insecte qui est devenu depuis 2008 le problème majeur car les dégâts que ce ravageur provoque sont considérables.

Il serait intéressant d'étudier l'effet antifongique de ces derniers en vue d'une recherche de fongicides naturels pour la protection et le traitement des produits contaminés par les champignons.

## V.2. Application au fruit des fraisiers

### V.2.1. Les maladies de la fraise

Les fraisiers peuvent être attaqués par plusieurs maladies fongiques, notamment la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), les fraises touchées par *Botrytis* se couvrent d'un feutrage grisâtre dense qui la rend impropre à la consommation. **Figure I.6,**

L'anthracnose et l'oïdium. Ces champignons, très nuisibles à la culture, peuvent être contrôlés par une application fongicide préventive.



**Figure I.6:** Fraises infectées par *Botrytis cinerea*

### **V.2.2. Huiles essentielles et hydrolats comme un moyen de lutte contre les maladies de fruits des fraisiers**

La fraise est un fruit particulièrement périssable pendant le stockage post-récolte. Les composés naturels sont des substances qui sont connues pour ne pas nuire à l'environnement et à la santé humaine et qui sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques.

Les huiles essentielles de plantes et leurs terpénoïdes, ont de nombreuses applications en médecine populaire, en préservation des aliments ainsi que dans les industries pharmaceutiques [173,174].

Cependant, très peu d'études ont documenté les effets antifongiques des huiles essentielles végétales pour contrôler les champignons des fruits de la fraise *in vivo* [175-177].

Des études ont démontré que l'huile de thym, l'huile de cumin et les traitements combinés avec *Lactobacillus plantarum* + huile de cumin et *Lactobacillus plantarum* + huile de thym ont permis un contrôle important des infections à *Botrytis* de fruits de fraise. Selon [178] l'application d'huiles de fenouil, d'anis, de menthe poivrée et de cannelle a montré que toutes ces huiles essentielles provoquaient une augmentation de la durée de conservation des fruits et inhibaient la croissance de *B. cinerea* par rapport aux témoins.

Les hydrolats sont des composés précieux non seulement pour les industries cosmétiques, mais aussi pour l'agriculture biologique contre les champignons et peuvent être utilisés pour la fertilisation des sols [179].

## ***Chapitre II: Matériels et méthodes***

*Cette partie est consacrée à la description des matériels et méthodes utilisés afin de mener à bien la présente étude. Elle englobera trois sous-parties essentielles.*

*La première portera sur la présentation des matières végétales utilisées, la seconde portera sur la technique d'extraction mise en œuvre ainsi que le principe de fonctionnement et enfin dans la dernière partie les méthodes d'analyses utilisées et les méthodes permettant d'accéder aux activités biologiques des extraits seront détaillées.*

### I. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle du *Daucus. carota ssp. sativus*

#### I.1. Extraction des huiles essentielles

Les racines et les parties aériennes de *Daucus carota ssp. sativus* ont été séchées à l'air libre (1 kg) pendant cinq jours à température ambiante, la teneur en eau était proche de 62,5% du poids de la plante puis soumis à une hydrodistillation pendant 5 heures dans un appareil de type Clevenger selon la Pharmacopée européenne [180].

#### I.2. Fractionnement des huiles essentielles

L'huile collective des racines (1 g) et des parties aériennes (0,8 g) obtenue par mélange de tous les échantillons d'huile, a été soumise à une Chromatographie flash (FC, gel de silice 200-500 µm, élution avec du n-pentane, puis avec de l'éther diéthylique). Deux fractions ont été obtenues: la fraction I apolaire constituée de composés hydrocarbonés(0,29 g pour les racines et 0,45 g pour les parties aériennes) et la fraction II polaire composée que des constituants oxygénés (0,71 g pour les racines et 0,35 g pour les parties aériennes).

#### I.3. Identification et quantification des composants

L'identification des composants a été basée: (i) sur la comparaison de leurs indices de rétention GC (IR) sur les colonnes polaires et polaires, déterminés par rapport aux temps de rétention d'une série de n-alcanes à interpolation linéaire, avec ceux des composés authentiques ou des données de la littérature [181-183] et (ii) aux spectres de masse avec des bibliothèques commerciales [184-186] et enfin aux spectres de masse de la bibliothèque de laboratoire interne de l'université de Corse. La quantification des constituants a été déterminée en utilisant le taux de % d'abondance des pics de normalisation calculé en intégrant les facteurs de réponse FID par rapport au tridécanne (0,7 g/100 g), utilisé comme étalon interne.

#### I.4. Provenance du matériel végétal et identification

Pour déterminer la composition de l'huile essentielle et l'étude de l'influence du lieu de récolte. Les échantillons de chaque organe (racines et parties aériennes) de *Daucus. carota ssp. sativus* ont été collectés dans 8 différentes stations (S1 à S8).

Les matières végétales (racines, parties aériennes) du *Daucus. carota ssp. sativus* ont été récoltées durant le mois de Mars 2014 dans différents stations.

Aïn fezza [34°87'78"N; 1°23'36"O] (S1), Ouchba [34°54'11"N; 1°12'47"O] (S2), Tiaret I [35°22'15"N; 1°19'01"E] (S3), Tiaret II [35°22'76"N; 1°19'32"E] (S4), Oulhaça I

[35°13'59"N; 1°30'16"O] (S5), Oulhaça II [35°11'52"N; 1°06'11"O] (S6), Rachgoun [35°19'20" N; 1°28'37" O] (S7) et Mostaganem [35°55'52" N; 0°05'21" E] (S8).

L'identification du matériel végétal a été botaniquement confirmée par le laboratoire d'écologie et de gestion des écosystèmes de l'Université de Tlemcen en Algérie.

### **II. Provenance du matériel végétal et identification du *Marrubium vulgare***

Les parties aériennes de *Marrubium vulgare* ont été récoltées dans les régions de Beni-Snous [34°38'35"N; 1°33'41"O], Tlemcen [34°40'40.902"N; 1°21'58.377"O] et Ain el Houtz [34°55'51.874"N; 1°19'26.499"O] en Mai 2014..

Pour le suivi végétatif, la station de Beni-Snous a été choisie comme zone d'étude.

Les échantillons ont été récoltés en 2014 pendant le mois de Février (stade végétatif), Avril (stade de floraison) et Juin (stade de pleine floraison).

L'identification a été réalisée par le professeur **Nouri BENABADJI** du Département de Biologie, de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, Algérie.

### **III. Provenance du matériel végétal et identification de *Ballota nigra***

Le matériel végétal a été récolté durant le mois d'Avril 2014, dans les localités de Ain Fezza [34°87'78"N; 1°23'36"O] (Tlemcen). La partie aérienne comprenant les tiges et les feuilles de la plante a été hydrodistillé pendant 5 heures dans un appareillage de type Clevenger donnant une huile de couleur jaune avec des rendements de 0.9% par rapport à la matière sèche..

L'identification de la plante du *Ballota nigra* a été faite par le Docteur **Choukri KAZI TANI** de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, Algérie.

### **IV. Provenance du matériel végétal et identification du *Cynoglossum cheirifolium***

Le matériel végétal a été récolté en Avril 2015, dans la localité de Ain Fezza [34°87'78"N; 1°23'36"O] (Tlemcen). La partie aérienne comprenant les tiges et les feuilles de la plante a été hydrodistillé pendant 5 heures dans un appareillage de type Clevenger donnant une huile de couleur jaune avec des rendements de 0.85% par rapport à la matière sèche.

L'identification de la plante du *Cynoglossum cheirifolium* a été réalisée par le Docteur **Choukri KAZI TANI** de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, Algérie.

### V. Extraction des huiles essentielles et des hydrolats

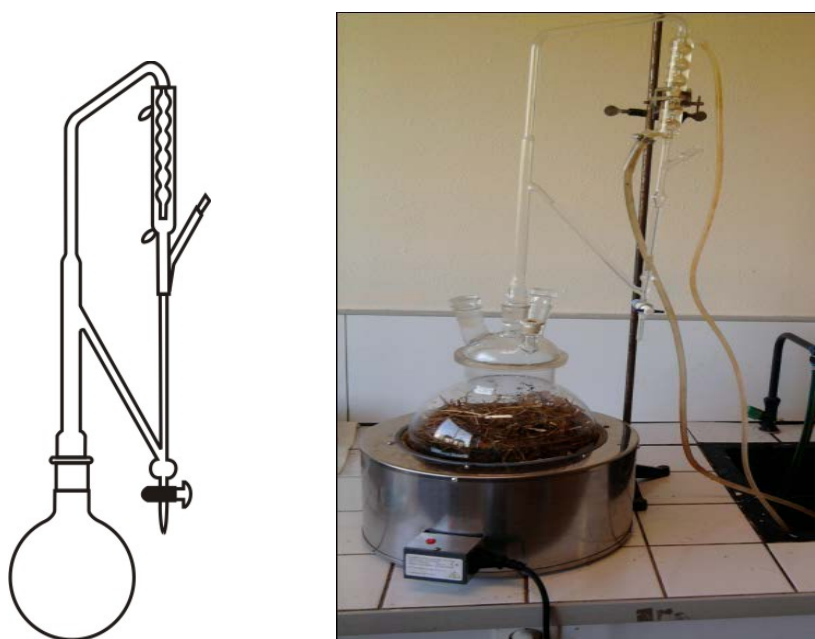
A l'échelle du laboratoire, la méthode usuelle pour l'obtention des huiles essentielles est l'hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger **Figure II.1** [187].

#### ➤ Extraction des huiles essentielles

Dans ce travail, les huiles essentielles de *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum cheirifolium* ont été obtenues par HD jusqu'à extraction totale de l'huile essentielle (5 heures en moyenne). Les huiles obtenues sont séchées sur du sulfate de magnésium.

Le rendement calculé par rapport à la masse de matière végétale sèche a été utilisé afin d'optimiser les conditions d'extraction.

Les huiles essentielles sont conservées dans des piluliers en verre ambré à 4°C jusqu'à analyse. Le dispositif expérimental utilisé dans notre travail est représenté dans la **Figure II.1**.



**Figure II.1:** Montage d'hydrodistillation

#### ➤ Extraction des hydrolats

Les extraits d'hydrolat de *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum cheirifolium* ont été obtenues, en récupérant le premier litre d'eau provenant de l'hydrodistillation.

Chaque hydrolat a été extrait trois fois avec 200 ml d'éther diéthylique. La phase organique a été séchée sur du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , puis évaporée en donnant une huile jaunâtre.

De même les extraits d'hydrolats sont conservés dans des piluliers en verre ambré à 4°C jusqu'à analyse.

### **VI. Les méthodes d'identification des huiles essentielles**

L'analyse de l'extrait qui est un mélange complexe de volatils s'effectue par le couplage d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la SM. Cette procédure est la plus utilisée lors de la réalisation d'analyse « de routine » d'un échantillon dont les constituants ne présentent pas de difficultés d'identification [188,189].

#### **VI.1. Analyse par CPG/FID**

Les analyses CPG ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin Elmer Clarus 600 GC équipé d'un système de détection d'ionisation à double flamme (FID) et de deux colonnes capillaires de silice fondue (60 x 0,22 mm ID, épaisseur de film 0,25 µm), apolaire Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et polaire Rtx-Wax (polyéthylène glycol). La température du four a été programmée de 60°C à 230°C à 2 °C/min et ensuite maintenue isothermiquement à 230°C pendant 35 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 280°C. Les échantillons ont été injectés en mode fractionné (1/50), en utilisant de l'hélium comme gaz porteur (1 mL/min), le volume d'injection était de 0,2 µl. Les indices de rétentions (IR) des composés ont été déterminés à partir du logiciel Perkin-Elmer.

#### **VI.2. Couplage CPG/Spectrométrie de masse**

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un analyseur quadripolaire Perkin-Elmer Turbo Mass, couplé à un Perkin-Elmer Auto system XL, équipé de deux colonnes capillaires de silice fondue (60 m x 0,22 mm d.i.; épaisseur du film: 0,25 µm), polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), et mis en œuvre avec les mêmes conditions de CPG décrites ci-dessus, à l'exception d'une scission de 1/80. Les spectres de masse à impact électronique (EI) ont été acquis dans les conditions suivantes: température de la source ionique 150 °C, ionisation énergétique 70 eV, plage de masse 35-350 Da (temps de balayage: 1s).

#### **VI.3. Méthodologie d'analyse**

L'identification des constituants d'une huile essentielle ou de la fraction volatile extraite d'une matrice d'origine végétale est réalisée par des techniques d'analyses conventionnelles. Celle-ci est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM.



Le mélange complexe des volatils est analysé simultanément par CPG/Ir et CPG/SM-IE. Le calcul des indices de rétention sur colonne polaires et apolaires, ainsi que la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir.

L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui sont par la suite comparés à l'aide d'un logiciel à ceux répertoriés dans la bibliothèque « Arômes » propre au laboratoire de Corse, cette bibliothèque a été constituée à partir de molécules disponibles dans le commerce et elle est enrichie continuellement par des molécules isolées par fractionnement à partir des huiles essentielles ou encore obtenues par hémi-synthèse et dans tous les cas, identifiées par RMN, ou dans d'autres bibliothèques commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées [190], [191,192], [184,185], [193], [186].

Par contre, on ne peut pas se limiter rien qu'à la note de concordance; il faut systématiquement examiner le spectre de masse du composé analysé pour avoir les informations nécessaires tels que l'ion moléculaire, les fragments caractéristiques ou encore la mise en évidence de co-élutions. Dans ce contexte, trois approches différentes (**a**, **b** et **c**) sont à prévoir:

a) L'identification du composé est réalisée sans difficultés, les données spectrales du constituant et ses indices de rétention correspondent à ceux de l'un des composés existant dans les bibliothèques afférentes du laboratoire. Sa structure peut être confirmée par RMN du carbone-13.

b) Le spectre de masse et les indices de rétention du constituant sont ceux d'un composé qui ne correspond pas aux données présentes dans les bibliothèques propres mais correspondent à celles d'un composé présent dans les bibliothèques commerciales (ou dans la littérature). Si c'est le cas, et si le spectre de masse du produit proposé est bien en accord avec la structure de ce dernier, on se base sur l'étude des fragmentations principales. Une hémi-synthèse suivie de l'identification du composé synthétisé par RMN du carbone 13 est complémentaire à cette approche.

c) les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne figurent pas dans aucune des bibliothèques. Alors deux cas sont possibles:

- Le composé est présent dans les bibliothèques RMN du carbone-13.

- Le composé est absent des bibliothèques RMN du carbone-13, donc nous n'avons pas une autre ressource que la purification du constituant pour une étude structurale.

C'est en se basant sur cette méthodologie que nous avons analysé les huiles essentielles et les extraits des hydrolats des différentes plantes étudiées.

### VII. Calcul du rendement

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle est défini par le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé. Il est exprimé en pourcentage (%), est calculé selon la formule suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = [(P1 - P2) / P3] \times 100$$

**P1:** poids du ballon après évaporation;

**P2:** poids du ballon avant évaporation (vide);

**P3:** poids de la matière végétale de départ.

### VIII. Etudes statistiques

Les travaux de recherche actuels sur les compositions chimiques des huiles essentielles, intègrent de plus en plus des variations de composition chimique induites par les critères environnementaux (altitude, nature du sol,...), physiologiques (morphologie du végétal) ou encore génétiques. Pour étudier cette variabilité chimique de l'huile essentielle, il est indispensable d'effectuer un traitement statistique de la matrice constituée par les pourcentages normalisés et standardisés des constituants des mélanges volatils.

Pour cela, les études statistiques ont été menées avec XLSTAT Version 2009.4.06. Les deux outils les plus utilisés sont l'Analyse en Composante Principale (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) [194]. Ces deux outils permettent d'avoir une vision synthétique, des similitudes ou des différences au sein d'un ensemble d'échantillons. Sans entrer dans les théories régissant les statistiques, nous allons montrer le parti que le chimiste peut en tirer.

### IX. Évaluation de l'activité anti-oxydante

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire.

L'activité anti-oxydante est évaluée soit par la méthode de piégeage du radical DPPH, soit par le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène, l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres se compare avec celle d'un antioxydant de référence.

Malgré une relative stabilité apparente et les soins apportés pour la conserver, tous les produits alimentaires subissent des altérations. Leur manipulation (transformation,

conditionnement, stockage...) éloigne les produits transformés de leur état originel. Une peroxydation lipidique peut survenir sous l'action des radicaux libres oxygénés (EOR) qui sont des espèces chimiques, possédant un ou plusieurs électron(s) célibataire(s) non apparié(s) sur leurs couches externes [195].

Cependant une étude montre que la surproduction des EOR peut provoquer une toxicité à l'origine de différentes pathologies [196]. Pour maintenir l'état souhaité des aliments, certaines pratiques emploient des antioxydants synthétiques. Ces derniers sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs afin de retarder l'oxydation lipidique. En raison de la toxicité de ces molécules anti-oxydantes (tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT)), leurs utilisations sont remises en cause et des travaux de recherches de nouvelles sources naturelles sont effectués [197].

Les huiles essentielles issues des substances naturelles connues par leurs activités antimicrobiennes, insecticides, et antifongiques et leurs intérêts socioéconomiques constituent un moyen de lutte naturel largement étudié [198]. En effet, en raison de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité anti-oxydante d'un composé *in vitro* et *in vivo*,

Ce présent travail consiste à une évaluation *in vitro* des capacités anti-oxydantes des huiles essentielles extraites des quatre plantes aromatiques de la région de Tlemcen "*Marrubium vulgare*, *Daucus. carota ssp. sativus*, *Cynoglossum cheirifolium* et *Ballota nigra*" par deux méthodes.

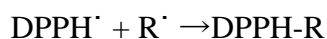
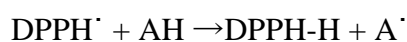
- Test du piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>
- Test de blanchiment du β-carotène.

### IX.1. Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>

#### IX.1.1. Principe:

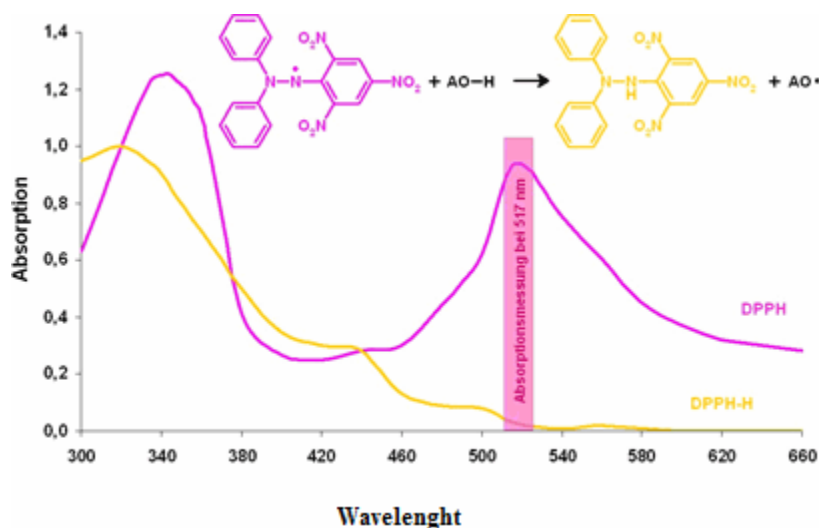
La méthode de DPPH consiste à utiliser un radical stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH, **Figure II.2**) dans du méthanol ou éthanol (dans la plupart des cas) [199].

La réduction du DPPH<sup>•</sup> est contrôlée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde caractéristique (515 nm). A cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par l'antioxydant (AH) ou un autre radical, l'absorption diminue.



Au départ le DPPH est sous sa forme 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl radicalaire. Ce radical a une couleur violette en raison de l'électron non apparié et de l'azote. Après réaction avec l'atome d'oxygène d'un capteur de radicaux, le DPPH-H réduit (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) qui est formé est jaune (**Figure II.2**).

Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm.



**Figure II.2:** Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive

### ➤ Protocole expérimental

À un volume de 1 mL d'une solution 0,006 % de DPPH dans l'éthanol, est additionné un même volume d'extraits de l'huile essentielle à différentes concentrations.

Après 30 mn, l'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS Spectrophotometer, Optizen POP).

- le blanc qui est constitué de 1 mL de la solution éthanolique au DPPH et de 1 mL d'éthanol.
- Le contrôle négatif composé de l'éthanol.
- Le contrôle positif, c'est un antioxydant de référence représenté soit par le BHT ou par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions [200].

### ➤ Détermination du pourcentage d'inhibition

Selon Sharififar *et al.*, [201], l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante:

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

Ac: Absorbance du contrôle;

At: Absorbance du test effectué.

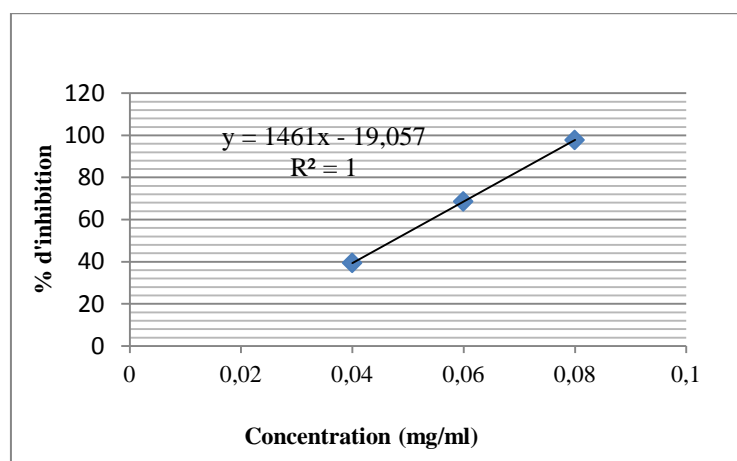
La valeur d'IC<sub>50</sub>, la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire (aussi appelée EC<sub>50</sub> pour Efficient concentration 50), a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculé en fonction des différentes concentrations d'échantillons préparés.

### IX.1.2. Droites d'étalonnage des échantillons

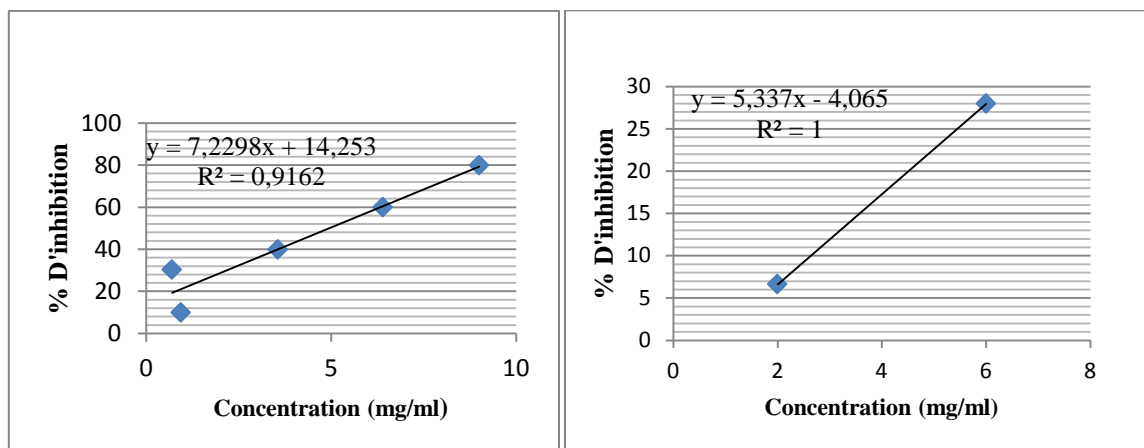
L'évaluation de l'activité anti-oxydante de nos huiles essentielles est déterminée par rapport à l'acide ascorbique. Nous avons tracé les courbes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

Les résultats du test du piégeage du radical libre DPPH : des huiles essentielles sont présentés sur la figure suivante:

- *Daucus. carota ssp. sativus*

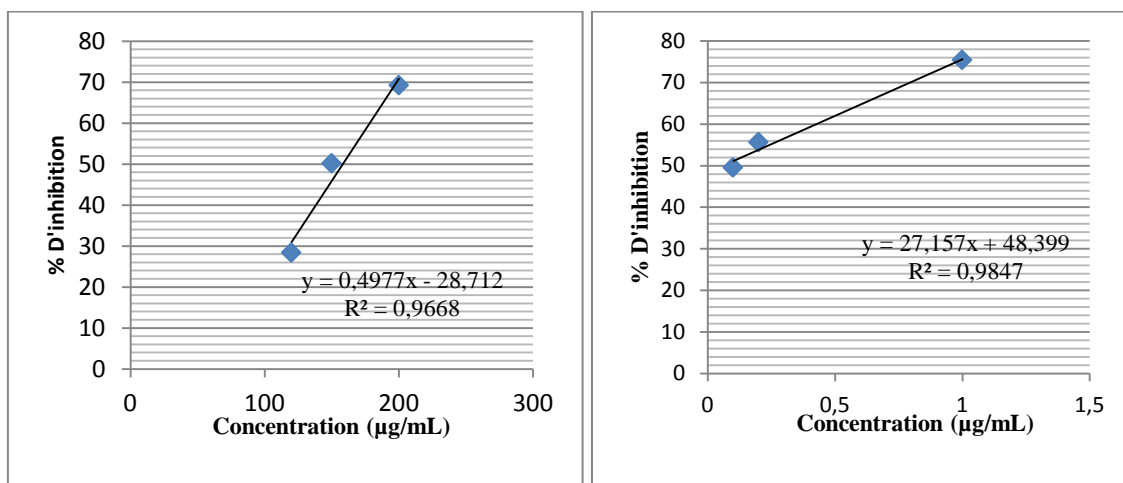


**Figure II.3:** Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'acide ascorbique



**Figure II.4:** Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration des huiles essentielles de *Daucus. carota ssp. sativus*, (a): racine, (b): partie aérienne

- *Marrubium vulgare*

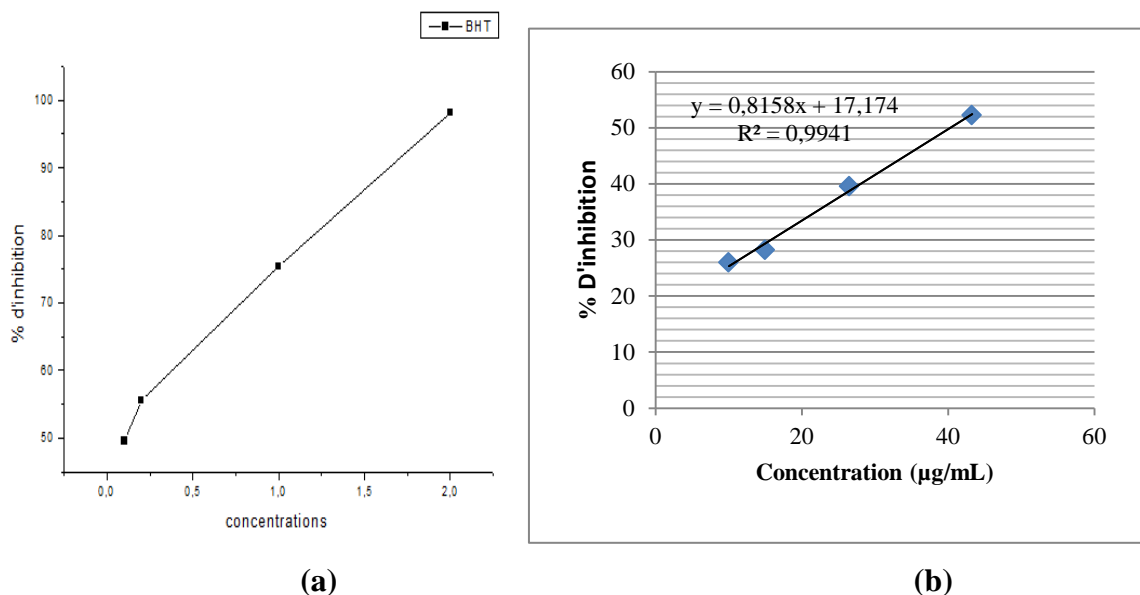


(a)

(b)

**Figure II.5:** Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration du BHT (a) et des huiles essentielles des parties aériennes de *Marrubium vulgare* (b)

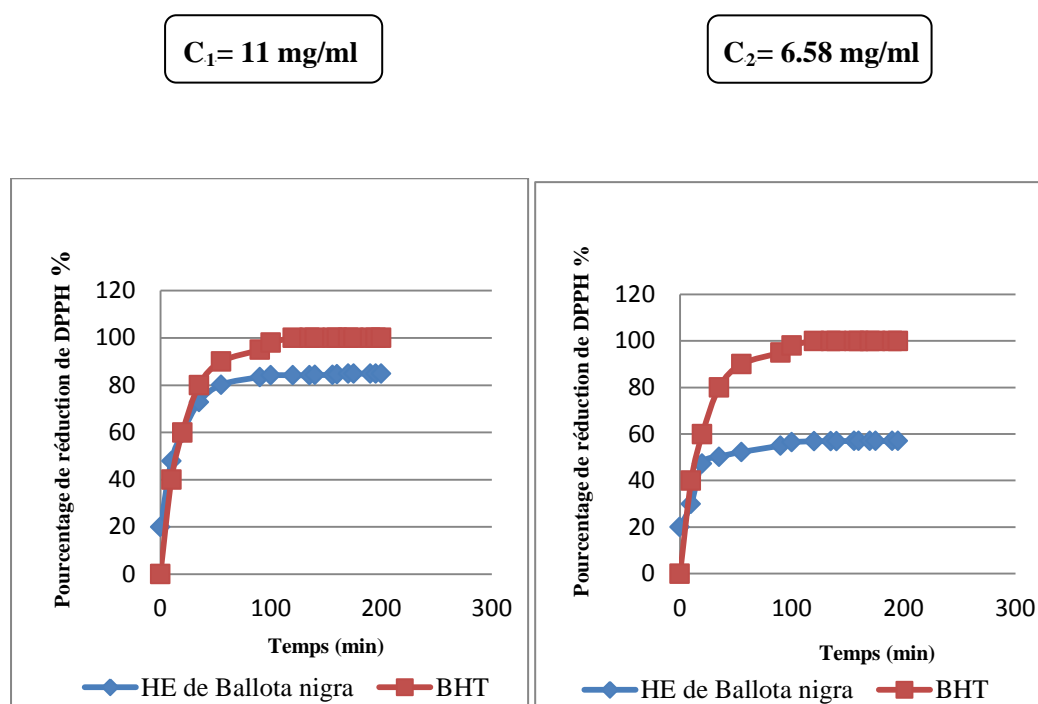
- *Cynolossum cheirifolium*



**Figure II.6:** Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration du BHT (a) et des huiles essentielles des parties aériennes de *Cynolossum cheirifolium* (b)

- *Ballota nigra*

La cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour chaque concentration du BHT et d'huile essentielle de *Ballota nigra* est indiquée dans la **Figure II.7**.



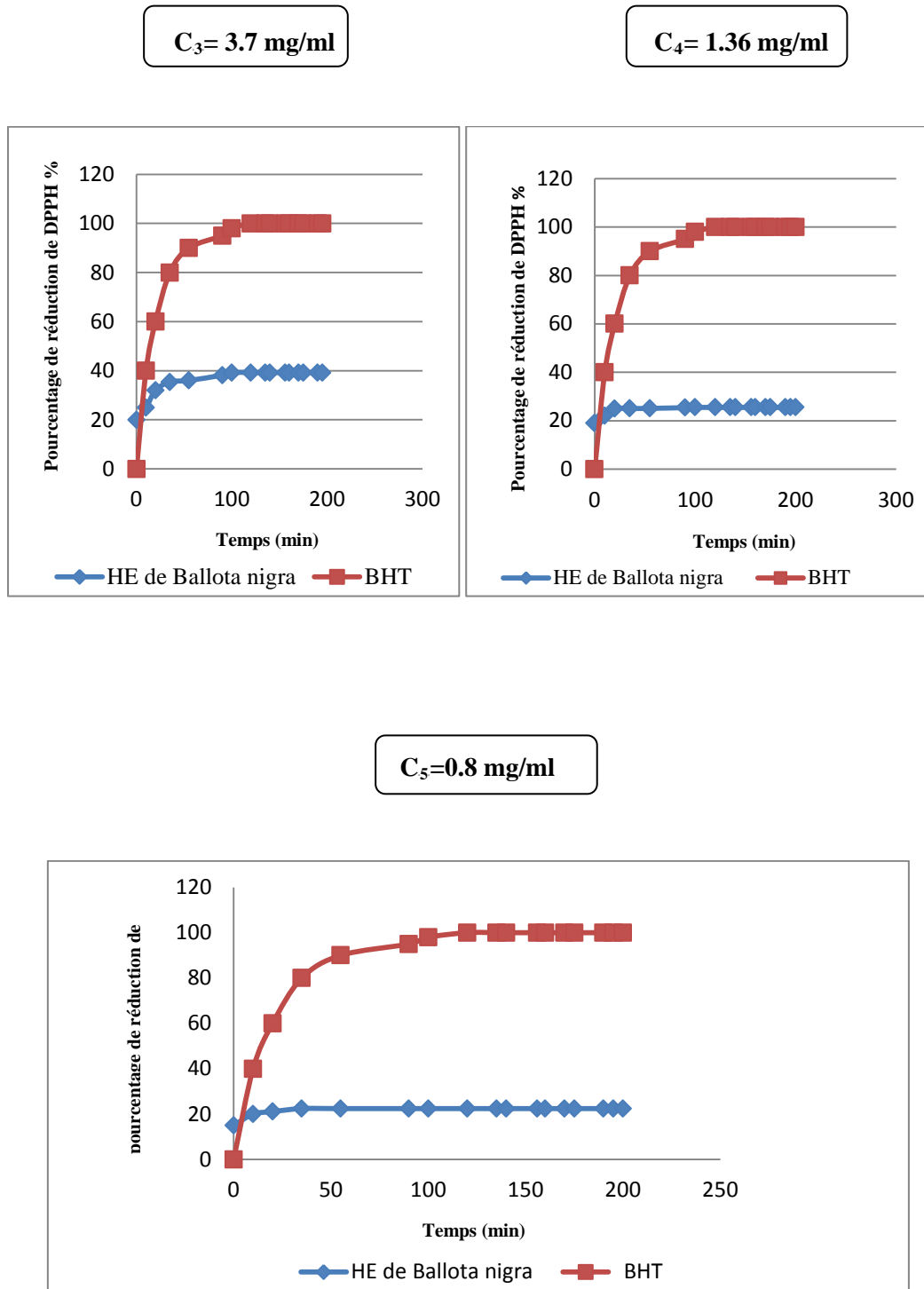


Figure II.7: Pourcentage de réduction de DPPH• de l'huile essentielle de *Ballota nigra* et du BHT en fonction de temps.



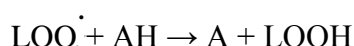
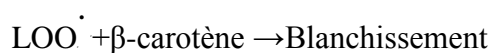
## **X. 2. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène**

### **X.2.1. Principe:**

l'activité anti-oxydante des huiles essentielles du *Marrubium vulgare*, de *Ballota nigra* et du *Cynoglossum cheirifolium* est mesurée selon la méthode de Tepe et *al.*, [202]. La  $\beta$ -carotène est oxydé par les radicaux  $\text{LOO}\cdot$ , produits lors de l'oxydation de l'acide linoléique. Cette oxydation entraîne une décoloration de la solution, qui sera suivi par lecture d'absorbance à 470 nm.

Cependant la présence d'un antioxydant pourrait prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène en neutralisant ces radicaux libres.

La capacité anti-oxydante est déterminée dans ce test, en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de la  $\beta$ -carotène (décoloration) par les radicaux libres [202].



#### ➤ **Protocole expérimental**

10 mg de  $\beta$ -carotène sont dissout dans 10 mL de chloroforme. On prélève 1mL de cette solution dans une fiole contenant préalablement 2 mL de Tween 20 et 200  $\mu\text{l}$  de l'acide linoléique. Après évaporation du chloroforme, 500 mL d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2.5 mL sont transférés dans des tubes auxquels sont additionnés 350  $\mu\text{L}$  de chaque huile à différentes concentrations et du BHT. Un tube contenant 2.5 mL d'émulsion et 350  $\mu\text{L}$  d'éthanol servira de témoin négatif. L'absorbance est immédiatement mesurée à 470 nm, d'autres lectures sont faites à différents intervalles de temps (2h, 4h, 6h, 12h et 48h) [202]. Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

#### ➤ **Expression des résultats:**

L'activité anti-oxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante:

$$\text{AAR} = (\text{Abs Échantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100$$

**AAR:** activité anti-oxydante relative.

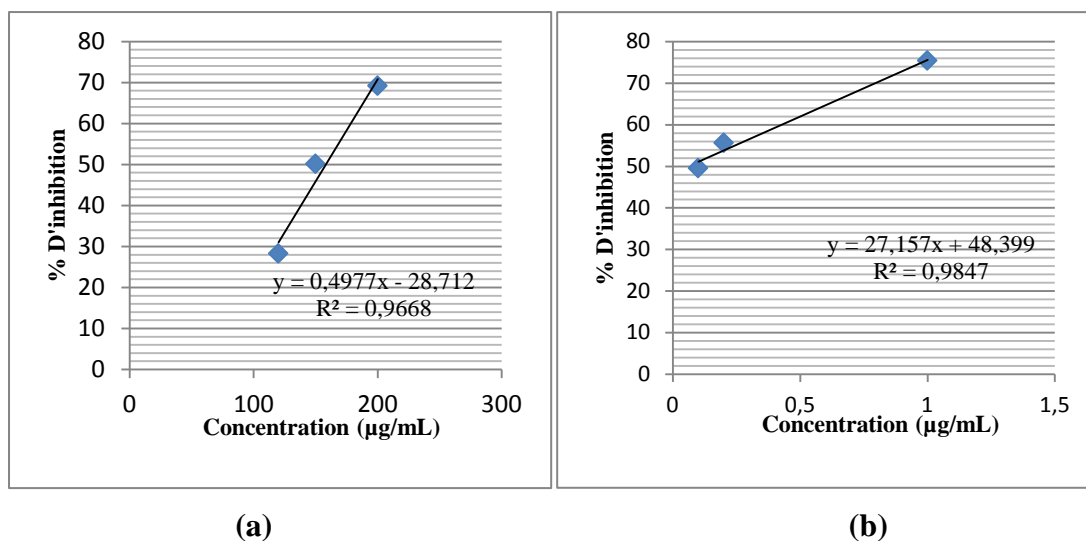
**Abs Échantillon:** absorbance de l'échantillon après 48 heures.

**Abs BHT:** absorbance du BHT après 48 heures.

### X.2.2. Droites d'étalonnage des échantillons

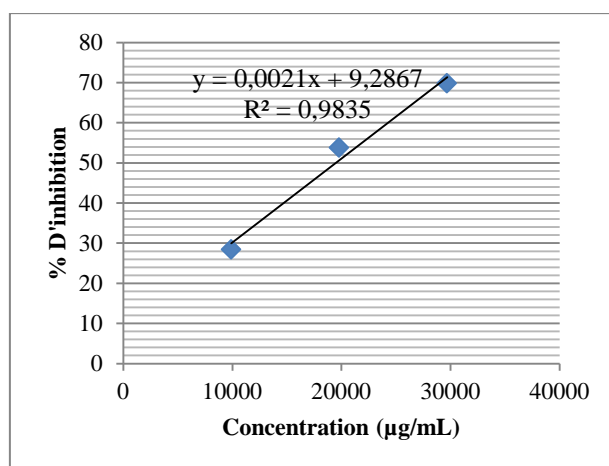
L'évaluation de l'activité anti-oxydante de nos huiles essentielles est déterminée par rapport au BHT. Nous avons tracé les courbes représentant la variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration. Les résultats sont présentés sur la figure suivante

- *Marrubium vulgare*



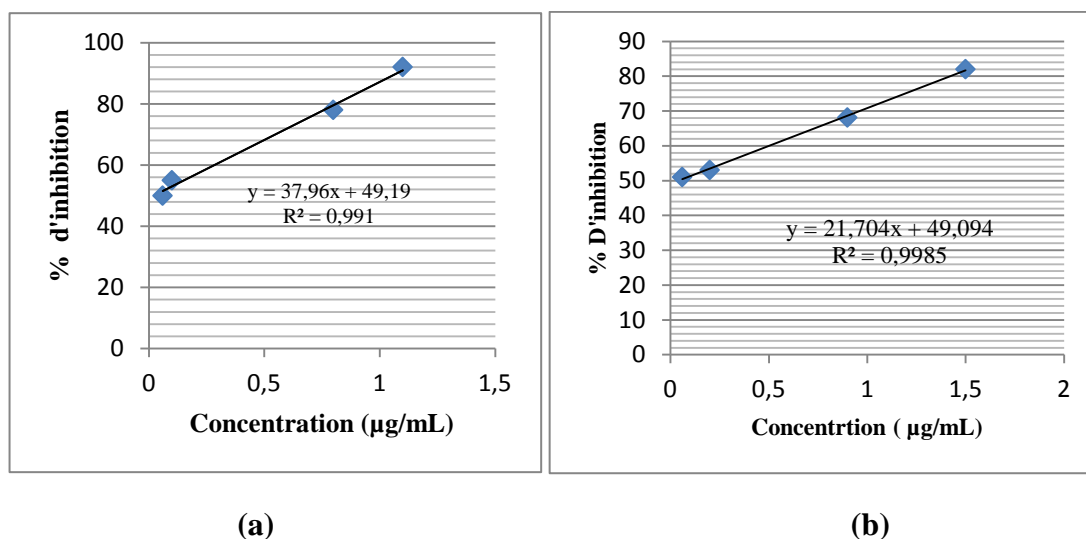
**Figure II.8:** Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration du BHT (a) et des huiles essentielles des parties aériennes de *Marrubium vulgare* (b)

- *Cynolossum cheirifolium*



**Figure II.9:** Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle *Cynolossum cheirifolium*

- *Ballota nigra*



**Figure II.10:** Variation du pouvoir d'inhibition en fonction de la concentration de BHT (a) et des huiles essentielles des parties aériennes l'huile essentielle de *Ballota nigra* (b)

### XI. Évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de l'hydrolat des racines de *Daucus. carota ssp. sativus* sur le fruit des fraisières

#### XI.1. Isolement des agents pathogènes

*Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* ont été isolés à partir des fruits pourris de fraises. Toutes les espèces fongiques isolées ont été prélevés et déposés dans des boîtes de Pétri de 9 cm stérilisés à trois fois avec une quantité d'acide lactique (20%) pour arrêter la croissance des bactéries. Les boîtes scellées ont été incubées à l'obscurité à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 8 jours. Les souches de champignons en voie de développement ont été identifiées sur la base de leurs caractères morphologiques et microscopiques en se basant sur les références suivantes [203-205].

#### XI.2. Activité antifongique *in vitro*

L'activité antifongique des huiles essentielles et des hydrolats été testée en utilisant la technique de croissance radiale [206].

##### ➤ Protocole expérimental

Des volumes appropriés des solutions mères des huiles essentielles dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10%, ont été ajoutés immédiatement au milieu PDA avant qu'il ne soit versé dans

des boîtes de Pétri (6,0 cm de diamètre) à 30°C pour obtenir une série de concentrations ( 10 à 70 mL/L pour les racines et de 100 à 500 mL/L pour les parties aériennes). À partir de 500 ml d'hydrolats obtenus à partir des racines et parties aériennes (section 2.1) avec des concentrations de 0,1 mL/L et 0,14 mL/L, respectivement, 10 microlitres ont été ajoutés directement au milieu PDA avant qu'il ne soit versé dans les boîtes de Pétri. Chaque concentration a été testée en triple. Des contrôles parallèles ont été réalisées avec du DMSO mélangé avec le PDA. Un disque de 9 mm de matière fongique mycélienne, découpée à la périphérie d'une culture de 5 jours d'âge cultivées sur PDA pendant 72h, ont été transférés et incubées de manière aseptique au centre des boites de pétri. Les témoins (sans huiles essentielles et extraits d'hydrolat) ont étaient inoculées de la même manière.

Les plaques étaient incubées à 27°C dans l'obscurité et les diamètres de la croissance des colonies étaient enregistrés chaque jour..

### XI.3. Calcul de pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des champignons traité par l'huile et l'hydrolat par rapport au témoin a été calculé pendant 7 jours, en utilisant la formule suivante [207].

$$I\% = [(DC-DT) / DC] \times 100$$

où **DC** et **DT** sont des diamètres moyens de colonie fongique de contrôle et de traitement, respectivement.

### XI.4. Activité antifongique *in vivo*

Le Procédé selon Tian et al. [208] a été utilisé et légèrement modifié afin de déterminer les effets de l'huile essentielle et de l'hydrolat sur des blessures inoculés (activité protectrice) et non ensemencés (activité préventive) des fraises.

Les fraises ont été achetées auprès d'un marché et sélectionnés par l'uniformité de taille, l'apparence, la maturité et l'absence de défauts physiques. Pour déterminer l'effet préventif de l'huile essentielle et hydrolat sur les fruits non inoculés et l'effet protecteur de l'huile essentielle et hydrolat sur les fruits avec une plaie inoculés.

#### ➤ Protocole expérimental

Les fruits de fraises sélectionnées pour les expériences ont été lavés à l'eau, trempé dans de l'éthanol (70%) pendant 2 minutes, puis rincé deux fois avec de l'eau bi distillée (10 min

chacun) et séché à l'air. Les surfaces des fraises stérilisées ont été blessées avec un clou à une profondeur uniforme de 3 mm. Les inoculums fongiques contenant  $10^6$  spores/mL ont été préparées par raclage de la matière de spores à partir de la surface des colonies avec un coton-tige humide et remise en suspension dans l'eau distillée contenant 0,5% de Tween 80.

Pour ne pas dénaturer le goût et l'odeur de fruits, une concentration de 10 mL/L d'huile essentielle a été utilisée, et appliquée sur des disques de papier filtre de quatre cm de diamètre et placé dans 1 boîte de polystyrène de volume d'1 L, pour atteindre la concentration finale de 0,01 mL/L d'air sans utiliser de solvant.

Pour l'hydrolat, les fruits de fraises ont été lavés directement avec l'hydrolat (0,1 mL/L) et placés dans des boîtes de polystyrène. Toutes les boîtes bien fermées ont ensuite été stockés à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 7 jours sous une pression de 692 mmHg et un taux d'humidité de 60%.

Pour le contrôle négatif, les fraises non inoculés ont été séparées de manière aléatoire, et traités de la manière décrite ci-dessus avec la même concentration d'huile et d'hydrolat.

Des expériences de contrôle ont été effectuées sans traitement d'huile essentielle et d'hydrolat. Toutes les expériences ont été répétées trois fois afin de déterminer les moyennes des résultats expérimentaux.

### **XII. Activité antifongique des huiles essentielles de *Marrubium vulgare*, *Daucus. carota ssp sativus*, *Cynoglossum cheirifolium* et *Ballota nigra* et de leurs hydrolats sur le fruit de la tomate**

#### **XII.1. Isolement des agents pathogènes**

Les différents champignons utilisés dans ce travail sont des espèces fongiques responsables des pourritures noire de tomates, les souches utilisées dans cette étude appartiennent à trois genres de moisissures: *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata*, elles ont été obtenues à partir des fruits de tomates présentant des symptômes de pourriture, maintenue dans un milieu de culture PDA (Potatoes Dextrose Agar) et conservé à l'étuve à  $23^\circ\text{C}$  pendant 15 jours à l'obscurité. Ces isolats ont été purifiés. Les souches de champignons en voie de développement ont été identifiées sur la base de leurs caractères morphologiques et microscopiques [203-205].

Les conidies ont été obtenues à partir de la surface de la gélose et mis en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile contenant 0,1% v/v de Tween 80. Les suspensions de spores ont été filtrées à travers quatre couches de gaze stérile pour éliminer les fragments de mycélium. Le nombre de spores a été calculé avec un compteur de cellules automatisé (Bio-Rad's TC20),

Cellometer vision, et la concentration des spores a été ajustée à  $1 \times 10^6$  spores /ml à l'aide d'un hémocytomètre avant usage.

### XII.2. Activité antifongique *in vitro*

L'activité antifongique des huiles essentielles et des extraits d'hydrolat a été testée contre les souches isolées. La méthode utilisée était la méthode publiée par Singh et al. [209] et modifier par Tian et al [168].

#### ➤ Protocole expérimental

Des aliquotes d'extraits dissous séparément dans 0,5 ml de DMSO à 10% (v/v) ont été introduits avec une pipette de manière aseptique dans des boîtes de Pétri en verre de 9 cm contenant 9,5 ml de PDA en fusion pour obtenir les concentrations requises d'huiles essentielles (10 et 30 mL/L pour l'huile des parties aériennes de chaque plante). Des plaques de contrôle (sans huiles essentielles) ont été inoculées selon la même procédure. Un disque de 9 mm de matière fongique mycélienne, découpée dans la périphérie d'une culture d'âge de 5 jours avec un perce-bouchon stérile, on a inoculé de façon aseptique au centre des boîtes de Pétri après traitement et celles de contrôle. Les plaques ont été scellées avec un film de polyéthylène et incubées à une température de 27 °C. L'efficacité du traitement a été évaluée chaque jour pendant 15 jours en mesurant la moyenne de 2 diamètres perpendiculaires de la colonie. Tous les tests ont été effectués en triple. Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des champignons testés par l'huile par rapport au témoin a été calculé pendant 15 jours, en utilisant la même formule citée précédemment [205].

Le même protocole expérimentale que celui de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Marrubium vulgare*, *Daucus carota ssp sativus*, *Cynoglossum cheirifolium* et *Ballota nigra* et de leurs hydrolats sur le fruit de la tomate et utilisé pour l'activité *in vitro* de l'huile essentielle du *Marrubium vulgare* contre les souches fongiques des tomates et des olives: *P. expansum*, *A. alternata*, *A. niger*, et *C. herbarum* avec des concentrations d'huile de 20, 40, 60 mL/L.

### XII.3. Activité antifongique *in vivo*

La méthode de Tian et al [163] a été utilisée et légèrement modifiée pour déterminer les effets de l'huile essentielle et de l'hydrolat sur des blessures inoculés des fruits de tomates (activité protectrice).

Pour chaque test, quatre fruits de tomate uniformes ont été choisis pour l'uniformité de taille, l'apparence, la maturité et l'absence de défauts physiques. Pour déterminer l'effet préventif de

l'huile essentielle et hydrolat sur les fruits des tomates non inoculés et l'effet protecteur de l'huile essentielle et hydrolat sur les fruits des tomates avec une plaie inoculés.

### ➤ Protocole expérimental

Les fruits de tomates sélectionnés pour les expériences ont été lavés dans de l'eau, plongés dans de l'éthanol (70%) pendant 2 min, puis rincés deux fois avec de l'eau stérile bi distillée (10 min chacun) séché à l'air. Les fruits de tomates stérilisés à la surface ont été blessés avec un clou stérilisé à la flamme à une profondeur uniforme de 3 mm.

Les inoculum fongiques contenant  $10^6$  spores/mL ont été préparées par raclage de la matière de spores à partir de la surface des colonies avec un coton-tige humide et remise en suspension dans l'eau distillée contenant 0,5% de Tween 80.

Pour ne pas dénaturer le goût et l'odeur de fruits, une concentration de 0,02 mL/L pour les huiles extraite des quatre plantes a été utilisé, et appliquée sur des disques de papier filtre de quatre cm de diamètre et placé dans une boîte de polystyrène de volume d'1 L, pour atteindre la concentration finale de 0,02 mL/L d'air sans utiliser de solvant.

Pour l'hydrolat, les fruits de tomates ont été lavés directement avec l'hydrolat des quatre plantes étudiées (0,1 mL/L) et placés dans des boîtes de polystyrène. Toutes les boîtes bien fermés ont été stockées ensuite à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 20 jours sous une pression de 692 mmHg et un taux d'humidité de 60%.

Des expériences de contrôle ont été effectuées sans traitement d'huile essentielle et d'hydrolat. Toutes les expériences ont été répétées trois fois afin de déterminer les moyennes des résultats expérimentaux.

Le pourcentage d'indice de maladie d'infection sur les fruits de tomates a été déterminé en utilisant la formule:

$$\text{DI (\%)} = \text{TNI} / \text{N} \times 100$$

**TNI:** nombre total de fruits de tomates infectés

**N:** nombre total de fruits de tomates évalués.

**XIII. Evaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* contre *Tuta absoluta*:**

➤ **Protocole expérimental**

Pour déterminer la toxicité fumigante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*, des concentrations appropriées, c'est-à-dire 7, 14 et 40 µL d'huiles essentielles, ont été appliquées séparément sur les papiers filtre (Whatman n°1, 2cm de diamètre), pour obtenir les concentrations finales 3, 5,7 et 20 µL d'air sans utiliser de solvant. Le papier filtre a été attaché à la sous-surface de couvercle du bocal en plastique de 50 ml de volume pour favoriser le mode d'action par inhalation.

Des bocaux témoins sont réalisés en parallèle, sans avoir mis de l'huile essentielle. Trois répétitions sont effectuées pour les doses et pour le témoin. Les bocaux contenant 10 insectes chacun tous du même âge, sont fermés hermétiquement pour éviter l'évaporation de notre produit et maintenus dans les mêmes conditions de température de 25-26°C et 80-85% d'humidité relative [210].

La mortalité a été vérifiée après 24 h du début de l'exposition. Le pourcentage de mortalité des insectes a été calculé en utilisant la formule de correction Abbott [211].

$$\% \text{ mortalité} = \left( 1 - \frac{nTa}{nCa} \right) \times 100$$

où  $nTa$  est le nombre d'individus survivants dans les insectes traités après traitement et  $nCa$  est le nombre d'individus survivants dans les témoins après traitement.



**Références bibliographiques**

- [1]. S. Droby. **2006**. Improving quality and safety of fresh fruit and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *Acta Horti culturae*. (709): 45–51.
- [2]. A. Amiri, R. Dugas, A.L. Pichot, G. Bompeix. **2008**. *In-vitro* and *in-vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*(126): 13-19.
- [3]. N. Dikbas, R. Kotan, F. Dadasoglu, F. Sahin. **2008**. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Sature jahortensis*. *Int. J. Food Microbiol.* (124): 179-182.
- [4]. R. R. Commare, R. Nandakumar, A. Kandan, S. Suresh, M. Bharathi, T. Raguchander, R. Samiyappan. **2002**. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop. Prot.* (21): 671- 677.
- [5]. M.A. Serrano, D. Martí'nez-Romero, F. Guille'n, J.M. Valverde, P.J. Zapata, S. Castillo, D. Valero. **2008**. The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology*. (19): 464-471.
- [6]. J. Paolini, C. Leandri, J.M. Desjobert, T. Barboni, J. Costa. Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species. **2008**. *J Chromatogr A*. 1193. (1-2): 37-49.
- [7]. P. Quezel, S. Santa. **1963**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, éd. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- [8]. M. Mbollo, M.A. Asseng Ze, S. Walter. **2006**. Les perspectives de la certification des produits forestiers non ligneux en Afrique centrale. *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture*.
- [9]. M.N. Boukhatem, M.S. Hamaidi, F. Saidi, Y. Hakim. **2010**. Extraction composition et propriétés physico-chimiques de l'HE du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L.*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature Technologie*. (3): 37-45.
- [10]. A. Marrouf, G. Tremblin. **2004**. Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences M. Rémond et, le laboratoire de thérapie génique à l'épreuve de la clinique: Sociologie d'une expérimentation biomédicale, Thèse, Paris.

- [11]. G. Heinrich, W. Schultze, I. Pfab, M. Boettger. **1983**. *The site of essential oil biosynthesis in Poncirus trifoliata and Monarda fistulosa. Physiologie Vegetale.* (21): 257-268.
- [12]. W. Cisowski. **1985**. Flavonoid compounds in *Myrrhis odorata* (L.) Scop. *Herba Polonica.* (31): 13-19.
- [13]. K.H. Kubeczka, A. Bartsch, I. Ullmann. **1982**. Recent studies on essential oils of Apiaceae. *Aetherische Oele, Ergeb. Int. Arbeitstag.* 158-187.
- [14]. Anonyme. **1974**. Encyclopédie-Le Grand Médical. L'histoire de la médecine et de la chirurgie, l'avenir de la médecine, les prix Nobel. Edition Service S.A., Genève (Suisse). 397.
- [15]. K. N'Guessan, B. Kadja, G.N. Zirih, D. Traoré, L. Aké-Assi. **2009**. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences and Nature J. 1* (6): 1-15.
- [16]. C. Muthu, M. Ayyanar, N. Raja, S. Ignacimuthu. **2006**. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram district of Tamil Nadu, India. *J Ethnobiol. Ethnomed J. 2* (43): 1-10.
- [17]. E. Lev. **2006**. Ethno-diversity within current ethno-pharmacology as part of Israeli traditional medicine – A review. *J. Ethnobiol. Ethnomed J. 2* (4): 1-12.
- [18]. K.K. Ajibesin, B.A. Ekpo, D.N. Bala, E.E. Essien, S.A. Adesanya. **2008**. Ethnobotanical survey of Akwa Ibom State of Nigeria. *J. Ethnopharmacol. J. 115* (3): 387-408.
- [19]. Herbert Waldron Faulkner, *The Mysteries of the Flowers.*, Frederick A. Stokes. **1917**. 210.
- [20]. A. Mokkaem, **1999**. Cause de dégradation des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. *In Revue Vie et Nature.* (7):24-26.
- [21]. « *Noxious weeds: Poison-hemlock* », Washington, King County.
- [22]. « *Hemlock Poisoning* », sur Medscape.
- [23]. *Encyclopédie des plantes médicinales*, Larousse, Paris. **2001**.
- [24]. J. Kula, K. Izydorczyk, A. Czajkowska, R. Bonikowski. **2006**. Chemical composition of carrot umbels oils from *Daucus carota ssp. sativus* cultivated in Poland. *Flavour Fragrance Journal.* (21): 667-669.
- [25]. R. Farhoudi, M.A. Mehrnia. **2013**. The essential oil composition and antioxidant activity of *Achillea* spp. growing in the southwest of Iran. *Journal of Medicinal Plants and By-Products.* (2): 123-130.

- [26]. P. Kainulainen, J. Tarhanen, K. Tiilikkala, J.K. Holopainen. **1998**. Foliar and Emission Composition of Essential Oil in Two Carrot Varieties. *Journal of Agricultural and Food. Chem.* (46): 3780-3784.
- [27]. Pline l'Ancien, *Histoires naturelles*, livre XX, 89.
- [28]. D'après Mastral, in Yannick Romieux, *De la hune au mortier*, Éditions ACL, Nantes. **1986**.
- [29]. L. Dellile. **2007**. *Les plantes médicinales d'Algérie*.
- [30]. M.H. Masoodi, B. Ahmed, I.M. Zargar, S.A. Khan, S. Khan, P. Singh. **2008**. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African J Biotechnol.* (7): 86-87.
- [31]. A. Boudjelal, C. Henchiri, L. Siracusa, M. Sari, G. Ruberto. **2012**. Compositional analysis and *in vivo* antidiabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia* (83): 286-292.
- [32]. G.S. Çitoğlu, F. Aksit. **2002**. Occurrence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. *Biochem Syst Ecol.* (30): 885–886.
- [33]. M.A.M. Nawwar, A.M.D. El-Mousallamy, H.H. Barakat, J. Buddrus, M. Linscheid. **1989**. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry.* (28): 3201-3206.
- [34]. Z. Papoutis, E. Kassi, S. Mitakou, N. Aligiannis, A. Tsiapara, G.P. Chrousos. **2006**. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* (98): 63-71.
- [35]. K.G.C. Weel, P.R. Venskutonis, A. Pukalskas, D. Gruzdiene, J.P.H. Linssen. **1999**. Activité antioxydante du marrube (*Marrubium vulgare* L.) cultivée en Lituanie. *Fett / Lipid.* (101): 395- 400.
- [36]. M. Nagy, E. Svajdlenka. **1998**. Comparaison des huiles essentielles de *Marrubium vulgare* L. et *M. peregrinum* L. *Journal of Essential Oil Research.* (10): 585-587.
- [37]. M. Khanavi, L. Ghasemian, E. Hosseiny Motlagh, A. Hadjiakhoondi, A. Shafiee. **2005**. Composition chimique des huiles essentielles de *Marrubium parviflorum* Fisch. & CALIFORNIE. Mey et *Marrubium vulgare* L. de l'Iran. *Flavour Fragrance Journal.* (20): 324-326.
- [38]. K. Morteza-Semnani, M. Saeedi, E. Babanezhad. **2008**. Composition de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. d'Iran. *Journal of Essential Oil.* (20): 488-490.
- [39]. A. Asadipour, M. Mehrabani, V. Nazeri, M. Tabarraii. **2005**. Composition de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. *Ulm-i-Daroei.* (2): 77-82.

- [40]. M.M. Saleh, K.W. Glombitza. **1989**. huile volatile de *Marrubium vulgare* et son activité anti-schistosomique. *Planta Med.* (55): 105.
- [41]. A. Kadri, Z. Zarai, A. Békir, N. Gharsallah, M. Damak, R. Gdoura. **2011**. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare L.* de Tunisie. *Revue Africaine de Biotechnologie.* (11): 19.
- [42]. W. Hamdaoui. Marley, B. Marzouk, N. Ben Brahim, B. Marzouk. **2013**. Composition des huiles essentielles de deux espèces de perroquets tunisiens: *Marrubium vulgare L. et Marrubium aschersonii Magnus.* (16): 608-612.
- [43]. U.N.E. Abadi, F. Abdellatif. **2013**. Les activités anti-oxydantes et antibactériennes des huiles essentielles de *Marrubium vulgare* en croissance sauvage en Algérie orientale. *Lettres Internationales de Chimie, Physique et Astronomie J.10.* (2): 159-166.
- [44]. C. Santos, P.A.G. Costa, M.M. Barroso, J.G. Pedro, LG. **2006**. Composition des huiles essentielles et trichomes glandulaires de *Marrubium vulgare L. Sauvages en Algérie.* *Journal of Essential Oil Research.* (18): 369-373.
- [45]. J.L. Ramaut, J. Lewalle, A. Donneaux, J. Damblon. **1980**. Plantes médicinales et condimentales. Société botanique de Liège et Laboratoire de botanique pharmaceutique, Université de Liège... 33.
- [46]. Chantal Ollier. **2013**. La Ballote noire, Le moniteur des pharmacies. (2966): 64 ([http://www.acppav.org/pmb/opac\\_css/doc\\_num.php?explnum\\_id=1982](http://www.acppav.org/pmb/opac_css/doc_num.php?explnum_id=1982)).
- [47]. J.J. Mongold, S. Camillieri, J.J. Serrano, C. Taillade, J. P Masse, P. Susplugas. **1991** Étude expérimentale de l'activité psychotrope de *Ballota nigra*. *Phytotherapy, journal de phytomédecine et phytopharmacie.* (36/37): 5-12.
- [48]. M. Majdi, D. Dastan, H. Maroofi. **2016**. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Ballota nigra Subsp. kurdica* From Iran, *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*
- [49]. E. Amiel, R. Ofir, N. Dudai, E. Soloway, T. Rabinsky, S. Rachmilevitch. **2012**. beta-Caryophyllene, Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. *Evid Based Complement Alternat Med.* 872394.
- [50]. K. Morteza-Semnani, M. Saeedi, M. Akbarzadeh. **2007**. The essential oil composition of *Ballota nigra*. *Chem Nat Compd. J.* 43 (6):722-3.
- [51]. A. Bader, C. Caponi, P. Cioni, G. Flamini, M. Ivano. **2003**. Composition of the essential oil of *Ballota undulata*, *B. nigra ssp. foetida* and *B. saxatilis*. *Flavour Fragrance J.*18. (6): 502-4.

- [52]. Z. Kazemizadeh, T. Amini, F. Nazari, Z. Habibi. **2009**. Volatile constituents of *Ballota nigra subsp. anatolica* from Iran. *Chem Nat Compd. J.* 45. (5): 737-8.
- [53]. E. Barbier, Mathez. **1973**. *candollea* (28): 306 Edition: librairie moderne, Rouiba, 195. en fonction des antécédents. *Presse Med.* **1999**. (28): 1624-8.
- [54]. Dr. A. martin-lauzer. **1889**. *Revue de thérapeutique médicaux chirurgicale*.
- [55]. A. Bela, B. Zarasagozi, I. Belda, J.E. Martinez, E. Seva. **2013**. Traditional knowledge of medicinal plants in the serra de Meriola Natural Park, South-Eastern Spain. *Afr j Tradit complement Altern Med.* 10 (2): 299-309.
- [56]. J.M. Lardy, V. Haberkorn. **2007**. L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Revue de Kinésithérapie.* (61): 14-17.
- [57]. M.E. Lucchesi. **2005**. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, *Thèse de Doctorat en Sciences, discipline Chimie. Université de la Réunion. Faculté des Sciences et Technologies.*
- [58]. J.G. Fouche, A. Marquet, A. Hambuckers. **2000**. *Les plantes Médicinale, de la plante au médicament. Observatoire du monde des plantes Sart-Tilman.*
- [59]. A. Zhiri. **2006**. Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News Sciences, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix.* (12): 8.
- [60]. T. Essawi, M. Srour. **2000**. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethno pharmacology.* (70): 343-349.
- [61]. J. Bruneton. **1993**. Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. *Tec & Doc, Lavoisier, Paris.* 915.
- [62]. Association Française de Normalisation. **1986**. Recueil de normes Françaises "Huiles essentielles", AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006.
- [63]. G. Heinrich, W. Schultze, I. Pfab, M. Boettger. **1983**. The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliata* and *Monarda fistulosa*. *Physiologie Végétale.* (21): 257-268.
- [64]. K.P. Svoboda, J.B. Hampson. **1999**. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- [65]. B. Smallfield. **2001**. Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop and Food Research.* (45): 4.

- [66]. M. Oussalah, S. Caillet, L. Saucier, M. Lacroix. **2006**. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*. (73): 236-244.
- [67]. S. Fellah, P.N. Diouf, M. Petrissans, D. Perrin, M. Romdhane, M. Abderrabba. **2006**. Chemical composition and antioxidant properties of *Salvia officinalis* L. oil from two culture sites in Tunisia. *Journal of Essential Oil Research* 18. (5): 553-556.
- [68]. P. Morin, H. Richard. **1985**. Thermal degradation of linalyl acetate during steam distillation in Proc. 4<sup>th</sup> Weurman Flav. Res. Symp. Elsevier Sci. Publ., B.V. Amsterdam. 563-576.
- [69]. J.D. Thompson, J.C. Chalchat, A. Michet, Y. B. Linhart, B. Ehlers. **2003**. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *J. Chem. Ecol.* 29 (4): 859-880.
- [70]. M. Wichtl, R. Anton. **1999**. Plantes Thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, Paris-Cachan. Editions Tec and Doc-Editions médicales internationales.
- [71]. P. Franchomme, D. Penoel. **1990**. Matière médicale aromatique fondamentale 317-406, livre quatrième, l'aromathérapie exactement, encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. R. Jollois Edit., Limoge, 446.
- [72]. J.N. Perry. al. **1999**. Red-blue plots for detecting clusters in count data. *Ecol. Lett.* (2): 106-113.
- [73]. Y.O.H. Assad, B. Torto, H.A. Hassana, P.G.N. Njagi, N.H.H. Bashir, H. Mahamat. **1997**. Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Phytochemistry* (44): 833-841.
- [74]. J.A. López, W. Barillas, J. Gomes-Laurito, G.E. Martin, A.J. Al-Rehaily, M.A. Zematis, P.L. Schiff Jr. **1997**. Granulosin: a new chromone from *Galipea granulosa*. *Journal of Natural Product* (60): 24-26.
- [75]. R. Anton, A. Lobstein. **2005**. Plantes aromatiques. Épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec and Doc, Paris (France).
- [76]. M. Lahlou. **2004**. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 435-448.
- [77]. A. Angioni, A. Barra, V. Coroneo, S. Dessi, P. Cabras. **2006**. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*

- essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54 (12): 4364-4370.
- [78]. M. Sökmen, J. Serkedjieva, D. Daferera, M. Gulluce, M. Polissiou, B. Tepe, A. Akpulat, F. Sahin, A. Sökmen. **2004**. *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (52): 3309-3311.
- [79]. K. Loziene, Pr. Venskutonis. **2005**. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33 (5): 517-525.
- [80]. J. Bruneton. **1999**. Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. 227-310-312-313-314.494.
- [81]. J. Garnero. **1991**. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. *Encyclopédie des médecines naturelles, phytothérapie, Aromathérapie*. Paris. 2-20.
- [82]. H. Fluck. **1973**. Petit Guide Panoramique des Herbes Médicinales. Delachaux et Nestlé Publishers, Lausanne, Switzerland. 119.
- [83]. P.P. Alvarez-Castellanos, M.J. Pascual-Villalobos. **2003**. Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Ind. Crop Prod.* (17): 77-81.
- [84]. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idoamar. **2008**. Biological effects of essential oils. *a review*. *Food Chem. Toxicol.* (46): 446–475.
- [85]. N.T. Dunford, R.S. Vazquez. **2005**. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *Journal of Applied Horticulture*. (7): 20-22.
- [86]. J. Garnero. **1985**. Semi preparitive separation of terpenoids from essential oil. *Phytotherapy*. (15): 19.
- [87]. N. Paster. AL. **1990**. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on molds and food borne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* (11): 33-37.
- [88]. D.R.L. Caccioni, M. Guizardi. **1994**. Inhibition of germination of fruit and postharvest pathogenic fungi by essential oil components. *J. Essent. Oil Res.* (6): 173-179.
- [89]. M.M. Cowan. **1999**. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* (12): 564-582.

- [90]. P.V. Nielsen, R. Rios. **2000**. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food Microbiol.* (60): 219-229.
- [91]. A. Lamiri, S. Lhaloui, B. Benjilali, M. Berrada. **2001**. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola Destructor* (Say). *Field Crops Research.* (71): 9-15.
- [92]. K. Cimanga. AL. **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 Ethno pharmacology.* (79): 213-220.
- [93]. A. Pauli. **2001**. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* (11): 126- 133.
- [94]. D. Fabian, M. Sabol, K. Domaracké, D. Bujnéková. **2006**. Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. in vitro* (20): 1435-1445.
- [95]. S. Burt. **2004**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International. Journal of Food Microbiol.* (94): 223-253.
- [96]. D. Kalemba, A. Kunicka. **2003**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* (10): 813-829.
- [97]. C.O. Pérez-Alfonso, D. Martínez-Romero, P.J. Zapata, M. Serrano, D. Valero, S. Castillo. **2012**. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *International Journal of Food Microbiology.* (158): 101-106.
- [98]. G.A. Helal, M.M. Sarhan, A.N. Abu Shahla, E.K. Abou El-Khair. **2007**. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *J Basic Microbiol.*47 (1): 5-15.
- [99]. J. Lehrner, G. Marwinski, S. Lehr, P. Jöhren, L. Deecke. **2005**. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. University Clinic of Neurology, Medical University of Vienna, Austria. *Physiol Behav.*15 (86): 92-5.
- [100]. E. Pemberton, P.G. Turpin Harris. **2008**. The effect of essential oils on work-related stress in intensive care unit nurses. Methodist Fort Worth Hospital, Fort Worth, Texas 76104, USA. *Holist Nurs Pract.*22 (2): 97-102.
- [101]. B.F. Bradley, N.J. Starkey, S.L. Brown, R.W. Lea. **2006**. Department of Psychology, University of Central Lancashire, Preston, Lancashire, UK. Evaluation of



- aromatherapy in treating postoperative pain: pilot study. Department of Anesthesiology, New York University Medical Center, New York 10016, USA. *Journal of Ethno pharmacol.* 111 (3):517-25.
- [102]. L.A. Anderson, J.B. Gross. **2015**. Department of Perioperative Nursing, University of Connecticut School of Medicine, Farmington, 06030- USA. 19 (1):29-35.
- [103]. M. Lis-Balchin. **2002**. Geranium and pelargonium: the genera Geranium and Pelargonium. CRC Press, *Taylor & Francis, London*. 116-131, 147-165, 184-217
- [104]. A. Ultee, M.H. Bennik, R. Moezelaar. **2002**. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* (68): 1561-1568.
- [105]. H.B. Heath. **1981**. 'Source Book of Flavors'. Springer, XXVI. 864.
- [106]. O. Beniamino. **1957**. 'Grasse, Centre Mondial des Matières Premières Aromatiques', *Revue de Géographie Alpine*. 45 (4): 763 - 774,.
- [107]. C. Blaquièrre, V. Ferrari, I. Girod-Quilain. **2006**. 'Les Arômes Alimentaires: Les Bases de la Réglementation Européenne', *Industries Alimentaires et Agricoles*.. 123. (6).
- [108]. G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni. **2011**. 'Comparative Evaluation of 11 Essential Oils of Different Origin as Functional Antioxidants, Antiradicals and Antimicrobials in Foods'. *Food Chemistry*, (91): 621- 632.
- [109]. R.S. Farag, E.A. Mahmoud, A.M. Basuny, R.F. Ali. **2006**. 'Influence of Crude Olive Leaf Juice on Rat Liver and Kidney Functions'. *International Journal of Food Science and Technology*. 41 (7): 790-798,.
- [110]. S.J. Lee, K. Umamo, T. Shibamoto, K.G. Lee. **2005**. Identification of Volatile Components in Brasil (*Ocimum Basilicum L.*) and Thyme Leaves (*Thymus Vulgaris L.*) and Their Antioxidant Properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 91 (1): 131-137.
- [111]. B. Shan, Y.Z. Cai, M. Sun, H. Corke. **2005**. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of their Phenolic Constituents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53 (20): 7749-7759.
- [112]. P. Jenner. **2003**. 'Oxidative Stress in Parkinson's Disease'. *Annals of Neurology*. 53, N° Supplement (3): 26-38,

- [113]. V. Lagouri, G. Blekas, M. Tsimidou, S. Kokkini, D. Boskou. **1993**. 'Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Oregano Plants Grown Wild in Greece'. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 197 (1): 20-23.
- [114]. N.A. Botsoglou, P. Florou-Paneri, E. Christaki, I. Giannenas, A.B. Spais. **2004**. Performance of rabbits and Oxidative Stability of Muscle Tissues as Affected by Dietary Supplementation With Oregano Essential Oil. *Archives of Animal Nutrition*, (58): 209-218.
- [115]. H.J. Kim, F. Chen, X. Wang, H.Y. Chung, Z. Jin. **2005**. 'Evaluation of Antioxidant Activity of Vetiver (*Vetiveria Zizanioides L.*) Oil and Identification of its Antioxidant Constituents'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (53): 7691-7695.
- [116]. H.J. Kim, F. Chen, C. Wu, X. Wang, H.Y. Chung, Z. Jin. **2004**. Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca Alternifolia*) Oil and its Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (52): 2849-2854.
- [117]. B. Tepe. **2008**. Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of The Methanolic Extracts of *Salvia Virgate* (Jacq), *Salvia Staminea* (Montbret & Aucher Ex Benth) and *Salvia Verbenaca* (L.) from Turkey. *Bio resource Technology*. 6. (99): 1584-1588.
- [118]. B. Tepe, E. Donmez, M. Unlu, F. Candan, D. Daferera, G. Vardar-Unlu, M. Polissiou, A. Sokmen. **2004**. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia Multicaulis* (Wahl). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 4 (84): 519-525.
- [119]. M. Viuda-Martos, Y. Ruiz Navajas, E. Sánchez Zapata, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez. **2009**. Antioxidant Activity of Essential Oils of Five Spice Plants Widely Used in a Mediterranean Diet. *Flavour and Fragrance Journal*. 1 (25): 13-19.
- [120]. K. Fisher, D. Phillips. **2008**. Potential Antimicrobial Uses of Essential Oils in Food: Is Citrus the Answer. *Trends in Food Science & Technology*. 3 (19): 156-164.
- [121]. R.F.M. Ali. **2011**. Antioxidative Effects of Pomposia Extract, on Lipid Oxidation and Quality of Ground Beef during Refrigerated Storage. *American Journal of Food Technology*. 1 (6): 52- 62.
- [122]. M.G. Miguel. **2010**. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils. *A Short Review*, *Molecules*. 12 (15): 9252-9287.

- [123]. R.H. Olmedo, V. Nepote, N.R. Grosso. **2012**. Aguaribay and Cedron Essential Oils as Natural Antioxidants in Oil-Roasted and Salted Peanuts. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 12 (89): 2195-2205.
- [124]. N. Mimica-dukic. **2003**. Aromatic Plants as Dietary Supplements in Human Health. *La phytothérapie Européenne*. (14): 13-18.
- [125]. S. Caillet. M. Lacroix. **2007**. Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- [126]. C.F. Carson, B.J. Mee, T.V. Riley. **2002**. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 46 (6): 1914-1920.
- [127]. S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham. **2000**. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol.* (88): 170-175.
- [128]. P.A. Cox. **1991**. Polynesian herbal medicine. In: P.A. Cox, S.A. Banack, (Eds.), Islands, plants, and Polynesians: An introduction to Polnesian ethnobotany. Dioscorides Press, Portland, Oregon. 147-168.
- [129]. I.J. Cseke, C.R. Lu, A. Kornfeld, P.B. Kaufman, A. Kirakosyan, S.L. Warber, J.A. Duke, H.L. Briemann. **1999**. Natural product from plants, How and why these compound are synthesized by plants, *edition taylor et francis, 2eme edition*. 611.
- [130]. H. Chiasson, N. Beloin. **2007**. Les huiles essentielles, des biopesticides nouveaux. *Revue de littérature. Bulletin de la société d'entomologie du Quebec. Antennae*. 14 (1): 3-6.
- [131]. S.M. Keita. al. **2001**. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum L.* and *O. gratissimum L.* applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.* (37): 339-349.
- [132]. A. Kellouche, N. Soltani. **2004**. Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile essentielle d'une d'entre elles sur *Collosobruchus maculatus* (F.), *International Journal of Tropical Insect Science*. 1 (24): 184-191.

- [133]. A. Kellouche. **2005**. Etude de la bruche du pois chiche *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera Bruchidae), physiologie, reproduction et lutte. *Thèse Doctorat d'état en Science Naturel. Univ. T.O.Z. Spécialité: Entomologie*. 216.
- [134]. D. R. Batish, H.P. Singh, R.K. Kohli, S. Kaur. **2008**. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecol. Manage.* (256): 2166-2174.
- [135]. A. Camara, **2009**. Lutte contre *Sitophilus oryzae* L. (coleoptera: curculionidae) et *Tribolium castaneum herbst* (coleoptera: tenebrionidae) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en basse-guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales. *Thèse, doctorat, U.N.I.V. Québec, Montréal*. 154.
- [136]. A. Kellouche, F. Ait Aider, K. Labdaoui, D. Moula, K. Ouendi, N. Hamadi, A. Ouramdane, B. Frerot, M. Mellouk. **2010**. Biological activity of ten essential oils against cowpea beetle *Callosobruchus maculatus Fabricius* (Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Integrative Biology*. 10. (2): 86- 89.
- [137]. D.G. Crosby. **1966**. Natural pest control agents. In Gould, R.F. (Ed.). *Natural Pest Control Agents. Advances in Chemistry Series*. (53): 1-16.
- [138]. GTZ-DFPV: Rapport atelier à Niamey/Niger 28/10 au 08/11/1996 sur l'utilisation des plantes et extraits de plantes dans la protection des cultures et des récoltes. **1996**. 21.
- [139]. N. Barbouche, B. Hajjem, G. Lognay, M. Ammar. **2001**. Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (2): 85-90.
- [140]. O. Khalfi-Habes, S. Sellami. **2010**. Activité biologique de trois huiles essentielles extraites de plantes algérienne sur *Rhyzopertha dominica* (F) (Coleoptera: Bostrychidae). Congrès de l'association marocaine protection des plants (Amp), 26-, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, 6.
- [141]. G. Tail. B. Doumandji-Mitiche. **2006**. Effet acridifuge des plantes *Melia azedarach*, *Nerium olcander* et *Inula viscosa* et de leurs extraits sur le comportement alimentaire du criquet pèlerin *Shistocerca gregaria*. Résumés de la VI ème conférence internationale d'entomologie. 2-6 juillet 2006, 99.
- [142]. H. Viaud. **1993**. Thérapeutiques naturelles. *GNOMA Ed*.
- [143]. P. Franchomme, D. Pénéol. **1990**. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. *Roger Jallois éditeur. Limoges*. 445.

- [144]. N. Bouanane, N. Boussehel. **2005**. Contribution agroécologique aux essais d'introduction de la menthe poivrée (*menthe piperata L*) dans la région de Ouargla en vue de l'utilisation des ses huiles essentielles en thérapie; mém Ing. Univ. Ouargla- (28): 22-23.
- [145]. J.C. Sommerard, R. Mary. **2012**. Eaux florales, un nouvel art de vivre Broché.
- [146]. D. Baudoux. **2000**. L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles. Douce Alternative, Biarritz, France. (221): 6-29
- [147]. L. Bosson, G. Dietz. **2005**. L'hydrolathérapie: Thérapie des eaux florales. Coll. Douce Alternative - Ed Amyris, Bruxelles. 3-20.
- [148]. X. Fernandez, C. André, A. Casale. Hydrolats et eaux florales-Vertus et applications-. Editions Vuibert.
- [149]. A. Goris, C. Vischniac. **1913**. Note sur la composition chimique des mousses *Sphagnum cymbifolium* Ehrh., *Hypnum purum* L Bull. sci. pharmacol. (20): 390.
- [150]. A. Smail, B. Lyoussi, M.G. Miguel. **2011**. Antioxidant Activity of Some Moroccan Hydrosols. *Journal of Medicinal Plants Research* 5. (30): 6688-96.
- [151]. J. Paolini, , C. Leandri, J.M. Desjobert, T. Barboni, J. Costa. **2008**. Comparison of Liquid-Liquid Extraction with Headspace Methods for the Characterization of Volatile Fractions of Commercial Hydrolats from Typically Mediterranean Species. *Journal of chromatography. A* 1193 (1-2): 37-49.
- [152]. M. Lis- Balchin, H. Steyrl, E. Krenn. **2003**. The Comparative Effect of Novel Pelargonium Essential Oils and Their Corresponding Hydrosols as Antimicrobial Agents in a Model Food System. *Journal of Phytotherapy research*. (65): 60-65.
- [153]. O. Sagdic, M. Ozcan. **2003**. Antibacterial Activity of Turkish Spice Hydrosols. *Journal of Food Control* (14): 141-43.
- [154]. N. Boyraz, O. Musa. **2006**. Inhibition of Phytopathogenic Fungi by Essential Oil, Hydrosol, Ground Material and Extract of Summer Savory (*Satureja Hortensis L.*) Growing Wild in Turkey. *International journal of food microbiology*. 107 (3): 238-42.
- [155]. S. Inouye, M. Takahashi, S. Abe. **2008**. A Comparative Study on the Composition of Forty Four Hydrosols and Their Essential Oils. *Journal of Essential Oil research*: 89-105.

- [156]. E.A. Carlini, A.B. de Oliveira, G.G. de Oliveira. **1983**. Psychopharmacological Effects of the Essential Oil Fraction and of the Hydrolate Obtained from the Seeds of *Licaria Puchury-Major*. *Journal of ethno pharmacology* 8. (2): 225–36.
- [157]. K.S. Souza, J.S. Chaar, K.M.T. Oliveira, E.O. Gomes, C.N. Portela. **2007**. Atividade de Biológica de Extratos, Hidrolatos E Óleos Voláteis de Pau-Rosa (*Aniba Duckei* Kostermans) E Quantificação Do Linalol No Hidrolato de Folhas. *Rev. Bras. Pl. Med.* (9): 1–7.
- [158]. S. Aydin, E. Seker, **2005**. Effect of an aqueous distillate of *Origanum onites* L on isolated rat fundus, *duodenum* and *ileum*: Evidence for the role of oxygenated monoterpenes. *Pharmazie.* (60): 147-150.
- [159]. R.S. Farag, Z.Y. Daw, F.M. Hewedi, G.S.A. El-Baroty. **1989**. Antimicrobial activity of some egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection.* (52): 665–667.
- [160]. S.G. Deans, K.P. Svoboda. **1989**. Antimicrobial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science*, (64): 205–210.
- [161]. S. Catty. **2001**. Hydrosols, the next aromatherapy. *Healing Arts Press. Rochester.* 290.
- [162]. K. Schnaubelt. **2005**. Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts. *International Journal of Aromatherapy* . (15): 98-105.
- [163]. A. Haougui. **1998**. Les pratiques culturale et leurs effets sur les ennemies des cultures, INRAN Niamey. 10.
- [164]. A. Kumar, R. Shukla, P. Singh, C.S. Prasad, N.K. Dubey. **2008**. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post-harvest fungal infestation of food commodities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* J.9 (4): 575-580.
- [165]. R. Croteau, R.E. Ketchum, R.M. Long, R. Kaspera, M.R. Wildung. **2006**. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem. Rev.* (5): 75-97.
- [166]. S. Kordali, A. Cakir, T.A. Akcin, E. Mete, A. Akcin, T. Aydin, H. Kilic. **2009**. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Ind. Crop Prod.* (29): 562-570
- [167]. W. Feng, J. Chen, X. Zheng, L. Liu. **2011**. Thym oil to control *Alternaria alternata* *in-vitro* and *in-vivo* as fumigant and contact treatments. *Food Control.* (22): 78-81.

- [168]. J. Tian, X. Ban, H. Zeng, J. He, B. Huang, Y. Wang. **2011**. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int. J. Food Microbiol.* (145): 464-470.
- [169]. N.G. Tzortzakis. **2010**. Ethanol, vinegar and *Origanum vulgare* oil vapour suppress the development of anthracnose rot in tomato fruit. *Int. J. Food Microbiol.* (142): 14-18.
- [170]. S. Lee, R. Tsao, C. Peterson, J.R. Coats. **1997**. Insecticidal activity of monoterpenes to western corn root worm (*Coleoptera: Chrysomelidae*), two spotted spider mite (*Acari: Tetanychidae*), and house fly (*Diptera: Muscidae*). *J. Econ. Entomol.* (90): 883-892.
- [171]. S.A.M. Abdelgaleil, M.I.E. Mohamed, M.E.I. Badawy, S.A.A. El-arami. **2009**. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilusoryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetyl cholinesterase activity. *J. Chem. Ecol.* (35): 518-525.
- [172]. S.S. Nathan, M.Y. Choia, H. Seoa, C.H. Paika, K. Kalaivania, J.D. Kim. **2008**. Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown plant hopper *Nilaparvatalugens* (Sta<sup>o</sup>1). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (70): 244-250.
- [173]. J.L. Maas. Compendium of strawberry diseases. **1998**. 2nd ed. APS Press, St. Paul.
- [174]. P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, S. Satya. **2014**. Bio-control potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Muscadomestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotox Environ Safe*, (100): 1-6.
- [175]. M.V. Bhaskara Reddy, P. Angers, A. Gosselin, J. Arul. **1998**. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry.* (47): 1515–1520.
- [176]. A. Asghari-Marjanlo, Y. Mostofi, S.H. Shoeibi, M. Fattahi. **2009**. Effect of cumin essential oil on postharvest decay and some quality factors of strawberry. *J. Med. Pl.* (8): 25–43.
- [177]. M. Zamani-Zadeha, S. Soleimanian-Zadb, M. Sheikh-Zeinoddina, S.A. Amir-Hosseini Goli. **2014**. Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit. *Post-Harvest Biology.* (92): 149–156.
- [178]. S. Mohammadi, A. Hossein, M.H. Aminifard, V. Jahanbakhsh. **2012**. *In-vitro* and *in-vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against

- strawberry grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Arch Phytopathology Plant Protect*, 45 (20): 2474-2484
- [179]. S. Kilani, I. Bouhlel, R. Ben Ammar, I. Ben Sghair Skandrani, J. Boubaker, A. Mahmoud, M.G. Dijoux- Franca, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira. **2007**. Chemical investigation of different extracts and essential oil from the tubers of (Tunisian) *Cyperus rotundus*. Correlation with their antiradical and antimutagenic properties. *Ann. Microbiol.* (57): 657–664.
- [180]. Council of Europe. **1997**. European Pharmacopoeia., first ed. Council of Europe, Strasbourg.
- [181]. W. Jennings, T. Shibamoto. **1980**. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, H.B. Jovanovich, ed. Academic Press, New York.
- [182]. W.A. König, D.H. Hochmuth, D. Joulain. **2001**. Terpenoids and Related Constituents of Essential oils. (Library of Mass Finder 2.1 ed.). Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
- [183]. National Institute of Standards and Technology. **2008**. NIST Chemistry Web Book, NIST Standard Reference Database. Author, Gaithersburg, MD.
- [184]. F.W. Mc Lafferty, D.B. Stauffer. **1988**. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data (Wiley-Interscience). 4th ed. Wiley, New York.
- [185]. F.W. Mc Lafferty, D.B. Stauffer. **1994**. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed., Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Palisade, Newfield.
- [186]. National Institute of Standards and Technology. **1999**. NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT.
- [187]. Pharmacopée Européenne, Conseil de l'Europe, Strasbourg, 5ième Edition. **2004**. Supplément 5.8.
- [188]. P.J. Marriott, R. Shellie, C. Cornwell. **2001**. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A.*, (936): 1-22.
- [189]. D. Joulain. **1994**. Method for Analysing Essential Oil. Modern Analysis Methodologies: Use and Abuse, *Perfum. Flavor.* (19): 5-17.
- [190]. W. Jennings, T. Shibamoto. **1998**. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography, *Ed. Jovanovitch H.B., Academic Press, New-York*. 1980.



- [191]. D. Joulain, W.A. König, *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*, Hambourg. Ed. E.B. Verlag.
- [192]. W.A. König, D.H. Hochmuth, D. Joulain. **2001**. Terpenoids and related constituents of essential oils. *Library of Mass Finder 2.1, Institute of organic chemistry, Hambourg, Germany*.
- [193]. R.P. Adams. **2001**. Identification of essential oil components by gaz chromatography /quadrupole mass spectroscopy. *Allured Publishing, Carol Stream, Illinois*.
- [194]. R.G. Brereton. **2003**. Chemometrics: Data Analysis of the Laboratory and Chemical Plant. *Wiley Interscience, New York*. 504.
- [195]. P.M. Gueye. **2007**. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. *thèse pour le doctorat Sciences Pharmaceutiques, Université Louis Pasteur, Strasbourg*.
- [196]. A. Meziti. **2009**. Activité anti-oxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* mémoire pour l'obtention du Diplôme de magister en biochimie appliquée université El-Haj Lakhdar Batna. 21-32.
- [197]. R. Amarowicz, D. Bautista, R.B. Pegg. **2000**. Antibacterial activity of green tea and experimental studies. *Int. J. Oncol.* (8): 221–238.
- [198]. M.L. Faleiro, G. Miguel, C. Guerrero, J. Brito. **1999**. Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L.) ssp. *mastichina* and *Thymus albicans* Hoffmanns. & Link. *Acta Horticulturae* (501): 45–48.
- [199]. A. Dvaranauskaite, P.R. Venskutonis, C. Raynaud, T. Talou, P. Viškelis, E. Dambrauskiene. **2008**. Characterization of steam volatiles in the essential oil of black currant buds and the antioxidant properties of different bud extracts. *J. Agric. Food Chem.* (56): 3279- 3286.
- [200]. S. Dash, N. Mohanty. **2001**. Evaluation of assays for the analysis of thermo tolerance and recovery potentials of seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.* (158): 1153-65.
- [201]. F. Sharififar, M.H. Moshafi, S.H. Mansouri, M. Khodashenas, M. Khoshnoodi. **2007**. *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* (18): 800–805.
- [202]. B. Tepe, M. Sokmen, H.A. Akpulat, A. Sokmen. **2006**. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* (95): 200-204.

- [203]. H.L. Barnett, B.B. Hunter. **2006**. Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>th</sup> Ed., The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota.
- [204]. G.S. De Hoog, J. Guarro (eds). **1995**. Atlas of Clinical Fungi. Baarn: Central bureau voor Schimmel cultures J. Müller.
- [205]. R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad. **2004**. Introduction to Food and Airborne Fungi. 7th Edn. Utrecht: Centraal bureau voor Schimmel cultures.
- [206]. V.K. Bajpai, A. Rahman, S.C. Kang. **2008**. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. (125): 117-122
- [207]. D.K. Pandey, N.N. Tripathi, R.D. Tripathi. **1982**. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptissuaveolens*. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz.* (89): 344-349.
- [208]. J. Tian, X. Zeng, A. Lü, A. Zhu, X. Peng, Y. Wang. **2015**. *Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes*. *LWT-Food Sci Technol.* (60): 63-70.
- [209]. P. Singh, B. Srivastava, A. Kumar, R. Kumar, N.K. Dubey, R. Gupta. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (88): 2421-2425.
- [210]. A. Kedia, B. Prakash, P.K. Mishra, C.S. Chanotiya, K.N. Dubey. **2014**. Antifungal, anti aflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *Int Biodeterior. Biodegrad.* (89): 29-36.
- [211]. W.S. Abbott. **1925**. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* (18): 265-267.

*Chapitre III: Extraction et caractérisation  
des huiles essentielles*

### **I. Introduction**

L'huile essentielle des *Daucus* est très utilisée en cosmétique, parfumerie et dans les industries agroalimentaires. Egalement connue comme dépurative et régénérante, elle est recommandée pour stimuler et régénérer l'organisme [1].

Dans cette première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une plante très utilisée en Algérie pour ses vertus sur la santé. A notre connaissance, c'est le premier travail qui traite l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat de la carotte cultivée d'Algérie. Il s'agit dans ce travail d'examiner d'une part, la composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat des racines et des parties aériennes et de les comparer à ceux reportées dans la littérature d'autre part.

### **II. Huiles essentielles et extraits des hydrolats de *Daucus. carota ssp. sativus***

#### **II.1. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle du *Daucus. carota ssp. sativus***

Pour déterminer la composition chimique de l'huile essentielle et l'étude de l'influence du lieu de récolte. Les échantillons de chaque organe (racines et parties aériennes) de *Daucus. carota ssp. sativus* ont été collectés dans 8 différentes stations (S1 à S8) (**Tableau III.1**).

Certaines informations concernant les 8 sites de récolte (origines, latitudes et longitudes) sont mentionnées dans le **Tableau III.1**.

**Tableau III.1:** Coordonnées géographiques et rendements des huiles essentielles relatives aux stations de récolte de *Daucus. carota ssp. sativus* d'Algérie

Echantillons	Stations	Coordonnées GPS	Altitude(m)	Climat	Rendements en huiles essentielles (%)	
					Racine	Partie aérienne
S1	Aïn fezza	34°87'78"N; -1°23'36"O	846	Sec	0.033	0.002
S2	Ouchba	34°54'11"N; 1°12'47"O	775	Sec	0.106	0.006
S3	Tiaret I	35°22'15"N; 1°19'01"E	1031	Sec	0.084	0.008
S4	Tiaret II	35°22'76"N; 1°19'32"E	1011	Sec	0.012	0.003
S5	Oulhaça I	35°13'59"N; 1°30'16"O	248	Humide	0.223	0.122
S6	Oulhaça II	35°11'52"N; 1°06'11"O	222	Humide	0.280	0.184
S7	Rachgoun	35°19'20" N; 1°28'37" O	35	Humide	0.200	0.144
S8	Mostaganem	35°55'52" N; 0°05'21" E	102	Humide	0.298	0.139

### **II.1.1. Rendements des huiles essentielles**

Comme le montre le **Tableau III.1**, les rendements en huile essentielle des différentes stations ont montré des différences significatives. Les résultats ont montré également que les rendements en huile essentielle varient considérablement en raison du site de récolte. Ils varient entre 0,012 à 0,298% **Tableau III.2**. Le rendement le plus élevé (0,298%) a été obtenu à partir de la station de Mostaganem (S8) dans une région humide et à 102 m d'altitude. Tandis que le rendement le plus faible (0,012%) a été obtenu à partir de la station de Tiaret (S4), une région sèche et 1011 m d'altitude.

Le rendement en huile essentielle de la station de Tiaret était 24 fois inférieur que celui de la station de Mostaganem (S8). Sur la base de la différence significative entre les rendements en huile essentielle, les 8 échantillons ont été classés en deux types.

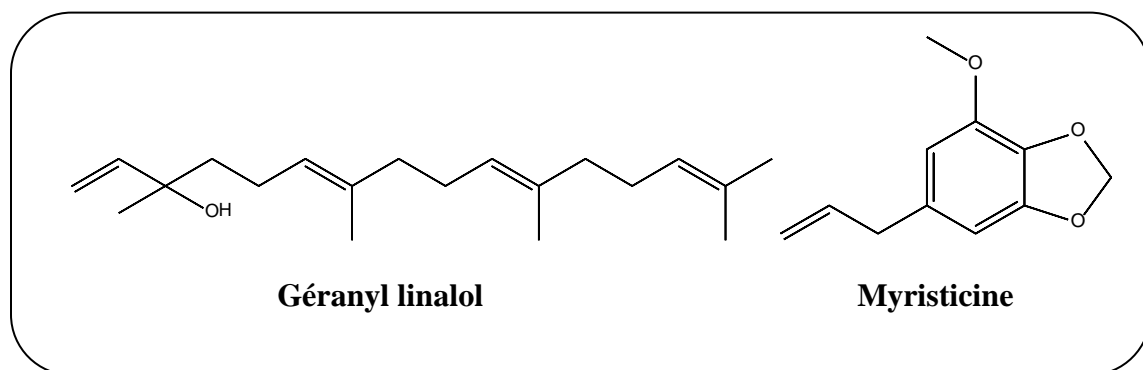
Type1: les échantillons provenant des stations de Ain Fezza, Ouchba, Tiaret I et II (S1 à S4), situés dans les régions à haute altitude et des climats secs sont caractérisés par des rendements plus faibles en huiles essentielles

Type 2: les échantillons provenant des stations de Mostaganem, Rachgoun, Oulhaça I et II (S5 à S8), situés dans les régions à basse altitude et des climats humides sont caractérisés par des rendements plus élevés en huile essentielle.

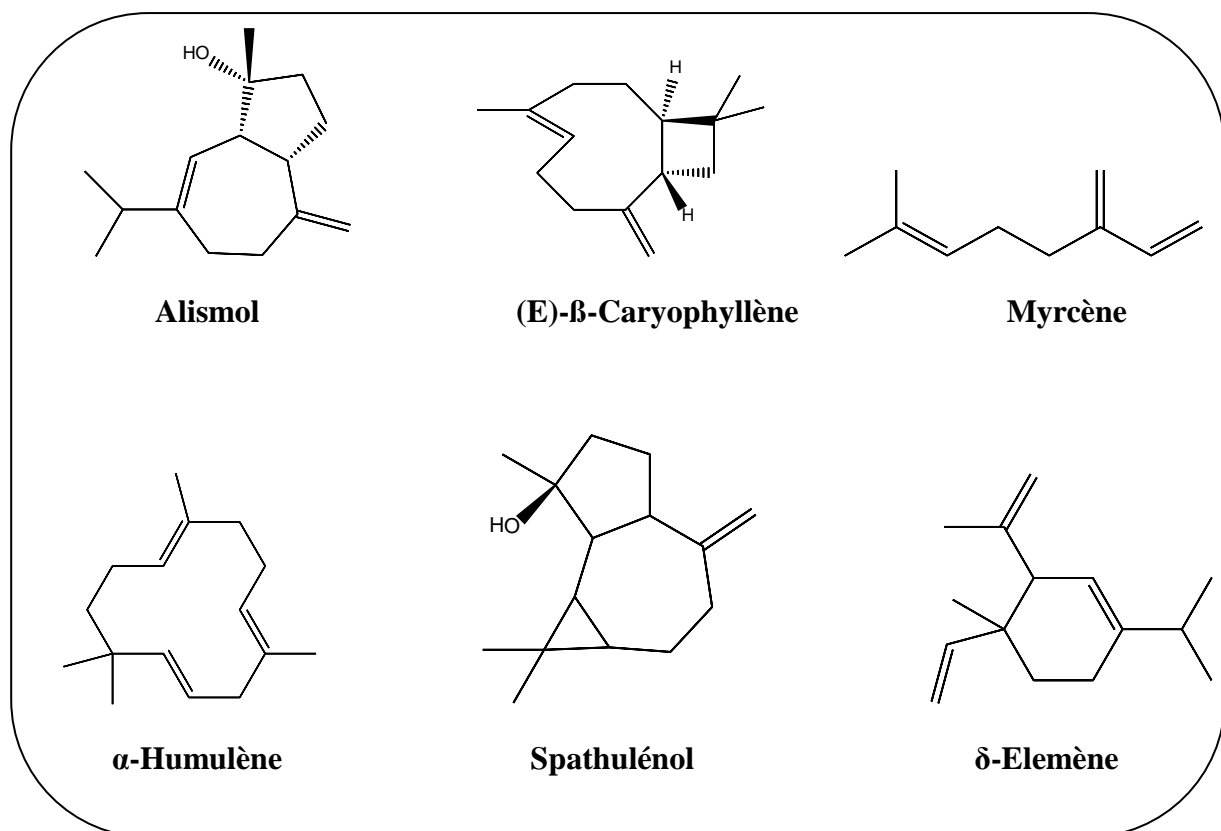
### **II.1.2. Composition chimique des huiles essentielles**

Le profil chromatographique des huiles essentielles obtenues à partir des racines et des parties aériennes de *Daucus. carota ssp. sativus* contenait une grande variété de composés en faibles proportions. Par conséquent, tous les échantillons des huiles ont été rassemblés pour produire une "huile essentielle collective" (HE Coll.) pour effectuer un fractionnement et d'analyse CPG / IR et CPG/SM. L'analyse de l'huile collective des racines et des parties aériennes, a représenté, respectivement un pourcentage d'identification de 92,7% et 95,2% de la composition chimique totale et a permis l'identification de 61 et 71 composés (**Tableau III.2**). Tous les composés ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (IR) et leurs spectres de masse (SM) avec ceux de la bibliothèque « Arômes », produite par le laboratoire de Corse, à l'exception de dix composés qui ont été identifiées par comparaison avec les données de la littérature (**Tableau III.2**).

Deux types d'huiles essentielles ont été produits par *Daucus. carota ssp. sativus*. L'huile essentielle collective (HE Coll) des racines est principalement constituée par des composés oxygénés (64,8%) et celle des parties aériennes est constituée par des composés hydrocarbonés (50,4%), et des composés oxygénés (45,2%). Les principaux constituants des racines étaient le géranyl linalol (**80**), un diterpène oxygéné présent avec une quantité significative (27,3%), suivi par la myristicine (7,3%) (**59**) et le pentacosane (5,6%) (**86**).



**Figure III.1:** Composés majoritaires identifiés dans l'H.E Coll des racines du *Daucus. carota ssp. sativus*



**Figure III.2:** Composés majoritaires identifiés dans l'H.E Coll des parties aériennes du *Daucus carota ssp. sativus*

A l'inverse, l'huile essentielle collective (HE Coll) des parties aériennes a été principalement constituée d'un mélange de sesquiterpènes hydrocarbonés (10,6%) et des terpènes oxygénés (64,8%): l'alismol (15,2%) (**71**), le (E)-β-caryophyllène (10,1%) (**53**), le myrcène (9,6%) (**16**), l'α-humulène (9,5%) (**55**), le spathuléol (4,2%) (**67**) et le δ-elemène (3,1%) (**44**) sont les principaux composants de l'huile essentielle de la partie aérienne.

Les études antérieures sur la composition chimique de l'huile essentielle des espèces *Daucus*, révèlent que l'huile essentielle de *Daucus carota ssp. sativus* d'Algérie est très différente des autres espèces, elle est caractérisée par la présence de l'alismol et de géranyl linalol (**Tableau III.2**).

Les structures chimiques des composés majoritaires de l'H.E Coll des racines et des parties aériennes sont représentées dans la **Figure III.1** et **Figure III.2** respectivement.

**II.1.3. Variabilité chimique inter-stations des huiles essentielles de *Daucus. carota ssp. sativus***

Bien que le profil chromatographique des 8 huiles essentielles des partie aériennes de *Daucus. carota ssp. sativus* contiennent les mêmes types de composés, il y avait des différences significatives dans les pourcentages des principaux composants: myrcène (2,1-13,3%) **(16)**,  $\delta$ -elemène (0,4-6,6%) **(44)**, (E)- $\beta$ -caryophyllène (2,5-12,1%) **(53)**,  $\alpha$ -humulène (3,4-13,4%) **(55)**,  $\beta$ -ionone (1,4 à 9,1%), spathulénol (2,1 à 14,3%) **(67)**, alismol (11,9 à 19,6%) **(71)** et le néophytadiène (1,1-8,4%) **(78)**.

En ce qui concerne les huiles essentielles des racines, il y avait aussi des différences significatives dans les pourcentages des principaux composants.



### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

**Tableau III.2:** Variabilité chimique des huiles essentielles du *Daucus. carota ssp. sativus* d'Algérie

N°	Composés <sup>a</sup>	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	Huiles essentielles de <i>D. carota ssp. sativus</i> <sup>f</sup>																			Identification <sup>h</sup>
					HE Coll. R <sup>e</sup>	Racines								Parties aériennes								HEColl AP <sup>g</sup>		
						RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	APS1	APS2	APS3	APS4	APS5	APS6	APS7	APS8			
1	Heptane	700	695	701	1.1	1.2	1.1	3.3	1.7	0.1	0.3	0.3	-	tr	0.1	tr	0.1	-	-	-	0.3	-	RI, MS	
2	Hexéanal	770	771	1048	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	0.2	-	0.2	-	-	-	-	-	-	RI, MS	
3	Octane	800	796	802	-	-	-	-	-	tr	0.1	-	-	0.1	-	tr	-	-	-	-	-	-	RI, MS	
4	(E)-2-Hexéanal	832	830	1202	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	tr	-	tr	-	-	-	-	-	-	RI, MS	
5	Heptanal	876	875	1185	0.2	-	-	0.1	0.5	0.1	0.2	0.3	0.1	0.5	0.1	0.4	0.3	0.2	0.2	tr	0.2	0.2	RI, MS	
6	3-Nonène	895	892	930	2.1	2.5	2.3	5.5	2.8	-	-	-	-	0.1	-	tr	-	-	-	-	-	-	RI, MS	
7	Nonane	900	898	900	0.9	0.5	0.6	1.1	0.4	-	-	-	-	tr	-	tr	-	-	-	-	-	-	RI, MS	
8	$\alpha$ -Thujène	932	925	1011	0.1	-	-	-	-	0.3	0.3	0.4	0.5	0.1	0.3	0.1	-	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2	RI, MS	
9	$\alpha$ -Pinène	936	930	1015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	0.7	0.5	-	0.2	-	0.2	0.2	0.3	RI, MS	
10	Camphène	950	943	1060	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	tr	-	-	-	-	-	-	RI, MS	
11	Octen-3-one	956	956	1289	-	-	-	-	-	tr	0.2	0.1	0.2	tr	-	0.1	-	-	-	-	-	-	RI, MS	
12	6-Méthyl-hept-5-én-2-one	966	960	1326	0.1	-	-	-	-	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	-	0.3	0.2	0.7	0.1	0.5	RI, MS	
13	Sabinène	973	965	1113	0.2	-	-	-	-	0.7	0.3	0.2	0.1	0.8	0.1	0.3	0.5	0.3	0.4	0.3	0.1	0.8	RI, MS	
14	$\beta$ -Pinène	978	970	1103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	tr	0.6	-	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	RI, MS	
15	2-Pentyl furane	981	977	1350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	tr	0.4	0.3	-	0.1	0.1	0.1	0.2	RI, MS Ref	
16	Myrcène	987	982	1152	2.5	2.8	3.2	3.1	7.9	1.7	1.2	1.7	1.8	13.1	13.3	10.1	10.2	3.2	3.4	3.8	2.1	9.6	RI, MS	
17	$\alpha$ -Terpinène	1013	1009	1267	0.5	0.1	tr	0.2	1.3	0.3	0.7	1.4	0.7	0.1	tr	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.1	0.2	RI, MS	
18	p-Cymène	1015	1011	1254	0.1	-	-	-	-	0.3	0.2	0.2	0.7	2.4	3.7	3.1	1.2	2.3	1.9	2.1	1.1	1.2	RI, MS	
19	Limonène	1025	1021	1194	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	0.5	0.7	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.6	1.1	RI, MS	
20	$\beta$ -Phellandène	1023	1021	1206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.8	0.2	0.1	Tr	tr	tr	0.1	RI, MS	
21	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1024	1025	1221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	tr	0.1	tr	0.2	0.1	0.5	-	0.1	RI, MS	
22	(E)- $\beta$ -Ocimène	1034	1036	1238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	1.4	1	0.9	0.4	0.5	0.8	0.4	0.6	RI, MS	
23	$\alpha$ -Terpinène	1051	1048	1233	0.3	0.2	0.5	0.1	0.3	0.8	0.2	0.1	0.8	0.5	tr	0.2	0.2	-	Tr	-	-	0.2	RI, MS	
24	(E)-Linalol oxyde THF	1058	1052	1430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	tr	0.1	-	-	-	-	-	RI, MS	
25	Nonan-2-one	1074	1069	1385	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.9	0.3	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.3	0.3	Tr	0.1	-	0.2	RI, MS	
26	Terpinolène	1082	1076	1275	0.5	-	tr	0.1	0.9	0.3	0.3	0.7	0.6	tr	0.8	0.1	0.1	0.5	0.3	0.9	0.3	0.5	RI, MS	
27	Nonanal	1076	1081	1386	1.2	1.4	3.3	1.1	1.6	2.5	1.4	0.6	3.8	0.4	tr	0.3	0.6	-	-	-	-	0.2	RI, MS	
28	Linalol	1086	1083	1540	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	-	0.9	1.3	-	-	-	-	0.6	RI, MS	
29	Perillène	1090	1086	1455	1.2	-	-	-	-	3.6	1.1	1.3	0.1	0.5	-	0.4	0.5	-	-	-	-	0.2	RI, MS Ref	
30	(E)-2-Nonenal	1136	1134	1520	0.9	1.7	2.9	0.5	1.2	0.3	0.5	0.2	0.1	1.5	1.7	1.4	2.1	3.9	3.3	1.2	2.1	1.8	RI, MS	
31	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1598	1.2	1.7	2.5	1.1	8.6	1.1	0.8	1.1	2.8	0.7	0.6	0.2	0.4	0.3	0.1	tr	0.3	0.5	RI, MS	
32	$\alpha$ -Terpinéol	1176	1173	1699	0.3	-	0.1	0.5	0.4	-	-	-	-	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	0.3	RI, MS	
33	Décanal	1180	1183	1491	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	-	-	-	0.1	tr	tr	0.2	-	-	-	-	-	RI, MS	
34	$\beta$ -Cyclocitral	1195	1196	1610	-	0.3	0.2	0.1	0.1	tr	-	-	-	0.1	-	0.1	0.3	-	-	-	-	-	RI, MS Ref	
35	Thymyl-méthyl-oxyde	1215	1214	1585	0.2	-	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	-	0.1	-	0.1	0.1	-	-	-	-	-	RI, MS	
36	3-Décen-2-one	1219	1221	1600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1	0.2	-	-	-	-	-	RI, MS	
37	(E)-2-Décennal	1240	1237	1645	0.5	0.9	0.6	0.1	0.5	0.1	0.3	0.8	0.4	0.3	0.3	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	tr	0.2	RI, MS	
38	Bornyl acétate	1270	1268	1570	3.8	3.4	6.1	5.2	7.1	4.8	2.5	3.0	3.1	0.6	0.6	0.4	0.3	0.5	0.4	0.7	0.4	0.5	RI, MS	
39	2-Un Décénone	1273	1272	1590	0.1	-	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	0.1	0.1	0.3	0.2	0.5	-	0.1	0.4	0.4	0.3	RI, MS	
40	(E,E)-2,2-Décadiénal	1291	1288	1816	1.2	1.1	2.4	3.4	1.1	0.4	0.1	0.9	2.1	0.1	tr	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	tr	0.2	RI, MS	
41	Theaspirane I	1299	1298	2476	0.5	0.1	0.4	0.6	0.5	0.2	0.1	0.1	0.3	0.2	tr	0.1	0.1	-	0.3	0.1	0.1	0.3	RI, MS	
42	Tridécane	1300	1304	1302	0.5	tr	tr	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.2	tr	-	0.1	tr	-	-	-	-	0.1	RI, MS	



### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

% Diterpènes hydrocarbonés	0.9	0.3	0.5	0.7	0.6	0.6	0.6	1.5	0.8	2.3	1.1	2.5	2.9	8.4	6.3	6.3	5.3	4.3
% Composés hydrocarbonés non-terpéniques	12.2	7.0	12.2	13.6	8.0	8.2	16.2	13.5	9.2	1.1	3.2	1.0	1.2	3.3	4.1	4.3	6.0	2.3
<b>% Composés Oxygénés</b>	<b>64.8</b>	<b>64.8</b>	<b>75.3</b>	<b>74.9</b>	<b>68.4</b>	<b>68</b>	<b>63.7</b>	<b>68.1</b>	<b>74</b>	<b>49.0</b>	<b>45.2</b>	<b>48.2</b>	<b>51.7</b>	<b>50.4</b>	<b>52.2</b>	<b>54.4</b>	<b>53.1</b>	<b>44.8</b>
% Monoterpènes oxygénés	9.3	11.5	10.6	9	19	11.1	5.6	6.8	7.0	6.4	5.9	4.8	6.1	12.1	8.9	12.0	11.0	10.2
% Sesquiterpènes oxygénés	14.3	26.1	17.8	20.3	15.7	13.9	10.7	16.5	6.2	32.2	27.6	30.8	32.3	23.2	28.1	27.3	27.8	24.0
% Phénylpropanoïds	8.8	16.1	19.1	6.2	4.4	5.4	2.9	2.7	3.0	2.4	6.3	3.5	2.3	3.6	5.4	7.0	5.1	3.4
% Diterpènes oxygénés	27.3	13.5	17.8	25.8	23.7	32.5	40.6	38.3	50.3	0.9	0.2	1.3	0.8	0.5	0.3	0.2	0.3	0.3
% Composés oxygénés non-terpéniques	5.1	5.5	6.2	6.1	5.6	5.1	3.9	3.8	7.5	7.1	5.2	7.8	10.2	11.0	9.5	7.9	8.9	6.9

<sup>a</sup>L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup>Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (*IRIa*) reportés par König et coll., 2001.

<sup>c</sup>Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (*RIa*).

<sup>d</sup>indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (*RIp*).

<sup>e</sup>HEcoll R: huile essentielles collective des racines.

<sup>f</sup>Stations: S1, Aïnfezza I; S2, Ouchba; S3, Tiaret I; S4, Tiaret II; S5, Oulhaça I; S6, Oulhaça II; S7, Rachgoun; S8, Mostaganem, pourcentage (moyenne de trois analyses)

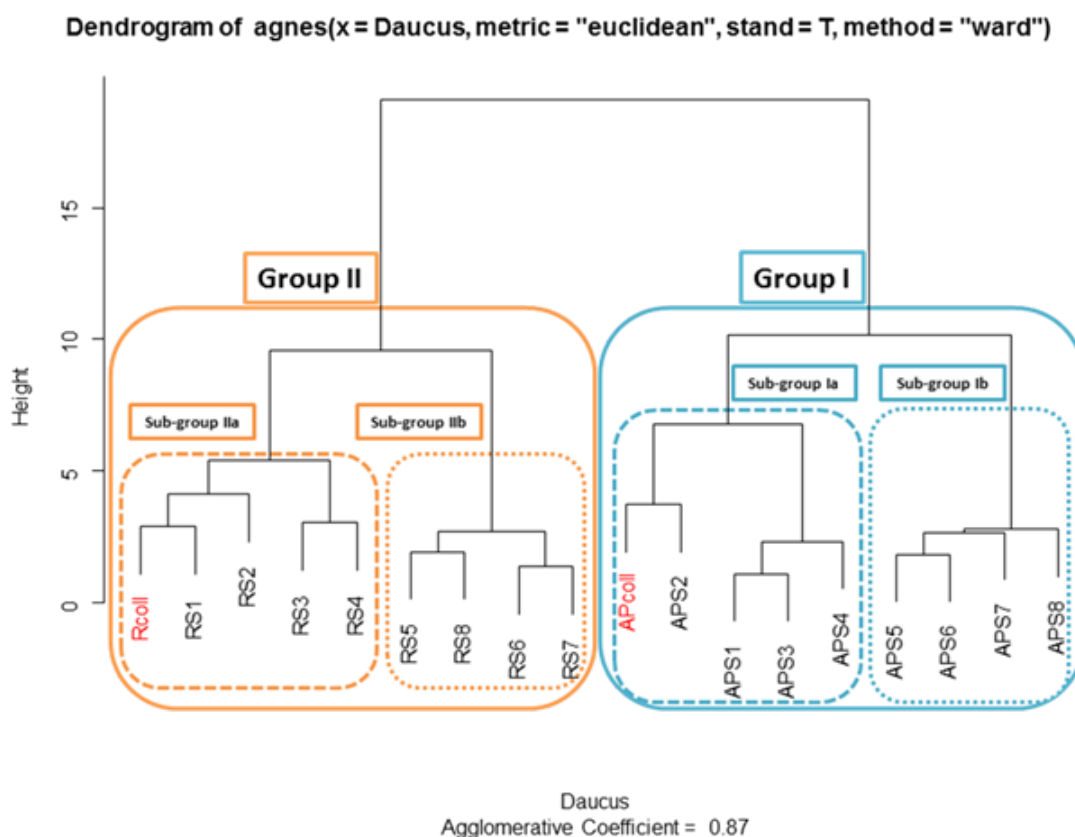
<sup>g</sup>HEcoll AP: huile essentielles collective des parties aériennes,

<sup>h</sup>RI: Indices de rétention; MS: Spectre de masse en mode impact électronique; Ref.: composés identifiés à partir des données de la littérature König et coll., 2001.

Par exemple, le géranyl linalol (**80**) varie de 13,5% à 50,3%, la myristicine (**59**) varie de 1,3% à 18,3% et le pentacosane (**86**) varie de 1,1% à 12,8% (**Tableau III.2**).

L'analyse de la composante principale (ACP) et du cluster (CA, dendrogrammes) a été appliquée afin d'identifier les relations possibles entre la composition des huiles essentielles et les facteurs environnementaux, en particulier les origines géographiques des échantillons.

Les données présentées sur les **Figure III.3** et **Figure III.4** ont été obtenus à partir de la matrice de corrélation et de la matrice normalisée. Le dendrogramme et le tracé établis à l'aide des deux premiers axes suggèrent qu'il existe deux groupes principaux de *Daucus. carota ssp. sativus* (**Figure III.3**).



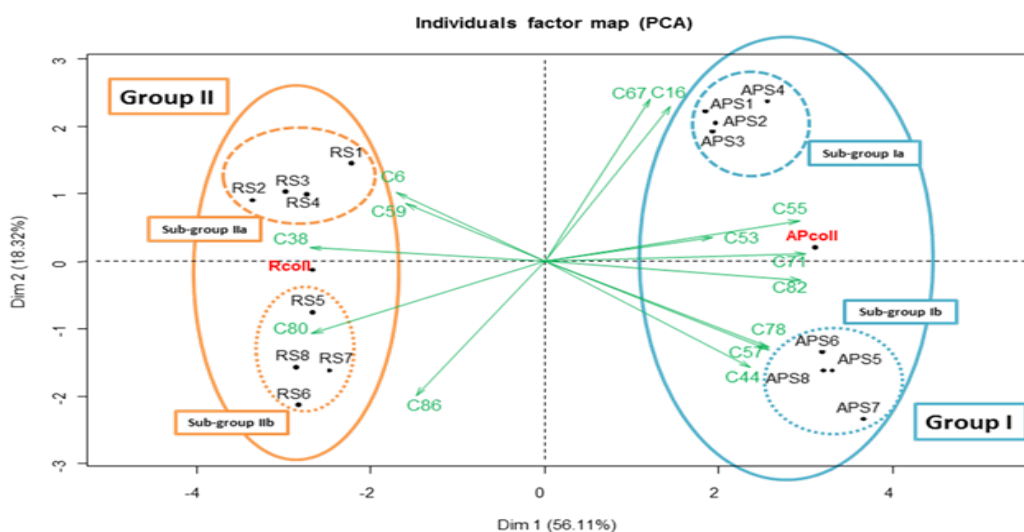
**Figure III.3:** Analyse par grappe (CA) de la composition chimique des huiles essentielles de *Daucus. carota ssp. sativus* d'Algérie (R: racine, AP: parties aériennes, S: échantillon)

Le groupe I comprend huit échantillons d'huile des parties aériennes (APS1-8) et le groupe II comprend huit échantillons d'huile de racines de *Daucus. carota ssp. sativus* (RS1-8).

Ces résultats confirment que l'huile essentielle produite par les racines étaient complètement différentes de l'huile essentielle produite par les parties aériennes.

**Le groupe (I)** a été subdivisé en deux sous-groupes. Le sous-groupe I<sub>a</sub> (APS1-4) provenant des stations à climat sec, caractérisé par une teneur importante en myrcène (10,1-13,3%) (16), de (E)- $\beta$ -caryophyllène (9,8-12,1%) (53), de spathuléol (9,2-14,3%) (67) et de l'alismol (12,3-14,2%) (71). Le sous-groupe I<sub>b</sub> (APS4-8) provenant des stations à climat humide, caractérisé par une teneur importante en  $\beta$ -ionone (5,4-9,1%) (57),  $\delta$ -elemène (3,5-6,6%) (44), néophytadiène (5,3-8,4%) (78) et alismol (11,9-19,6%) (71).

Alors que le second **groupe (II)** (RS1-8) a été subdivisé en deux sous-groupes selon les pourcentages des principaux composants tels que le géranyl linalol, la myristicine et le pentacosane (Tableau III.2). Le premier sous-groupe II<sub>a</sub> (RS1-4, climat sec) constitué par un pourcentage élevé en géranyl linalool (13,5-25,8%) (80) et la myristicine (4,5-18,3%) (59). Le second sous-groupe II<sub>b</sub> (RS5-8, climat humide) est constitué principalement par des pourcentages élevé en géranyl linalol (32,5-50,3%) (80) et le pentacosane (0,3-12,8%) (86) (Figure III.4).



**Figure III.4:** Analyse des principaux composés (ACP) de la composition chimique des huiles essentielles de *Daucus carota. ssp. sativus* d'Algérie (R: racine, AP: parties aériennes, S: échantillon, C: composés de Tableau III.2).

### II.1.4. Discussions

La longue histoire décrivant l'utilisation d'extraits de plantes à des fins médicinales suggère fortement que certains composants pharmacologiquement actifs sont présents dans les extraits et certaines huiles essentielles [2]. Les carottes constituent une source précieuse d'ingrédients favorisant la santé tels que la carotène et sont donc importantes dans l'alimentation humaine [3]. Les carottes ont été utilisées traditionnellement dans le traitement de l'ankylostomose, de l'hydropisie, de la maladie rénale chronique et des affections de la vessie [4]. Les carottes sont considérées comme des plantes aromatiques, qui produisent des substances volatiles comme constituants des huiles essentielles extraites des racines, des feuilles, des ombelles et des graines. Les variations de la composition de l'huile essentielle d'une plante aromatique dépendent de plusieurs facteurs tels que le génotype, les conditions climatiques, les parties de plantes utilisées, les lieux géographiques, la saison de la collecte, le stade de développement et la transformation des matières végétales avant l'extraction des huiles essentielles [5,6]. Ainsi, la même espèce/variété est capable de produire des huiles essentielles de compositions différentes [5].

Effectivement, des variations qualitatives et quantitatives élevées de la composition chimique des huiles essentielles des espèces de *Daucus carota* ont été révélées. Dans la plupart des espèces étudiées, les hydrocarbures monoterpéniques dominent et représentent 25 à 75% de tous les composants volatils [7]. Les composants les plus courants sont le myrcène,  $\alpha$ -pinène et le sabinène, mais leurs quantités varient en fonction de l'espèce et de l'organe de la plante et en plus du stade de développement [7-9]. Une autre fraction importante de ces espèces et sous-espèces peut être les phényles propanoïdes tels que le (E)-méthyle isoérogénol [8], l'isochavicol [10,11], la myristicine, le dillapiole, l'apiole et l'elemicine [8-12,13]. Ils sont habituellement suivis des sesquiterpènes hydrocarbonés tandis que les terpènes oxygénés sont faibles. Les composés majoritaires des huiles essentielles des différentes espèces des *Daucus carota* provenant de différentes origines rapportés dans la littérature sont résumés dans le (Tableau III.3).

#### ▪ *Daucus carota ssp. sativus*

Les travaux antérieurs [7,9,16,17] montrent que les principaux constituants de l'huile essentielle de *Daucus carota ssp. sativus* de Pologne, d'Iran et de Suède étaient  $\alpha$ -pinène (40,0-46,0%), sabinène (12,0-24,0%), (E)- $\beta$ -caryophyllène (4,6-13,2%), trans-anéthol (23,5%), carotol (10,7-48,0%), myrcène (14,5%), (E)- $\beta$ -ocimène(8,0-11,3%)et le méthyle isoeugénol (19,7-55,3%) (Tableau III.3). Les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des différentes parties de

*Daucus. carota ssp. sativus*, recueillies dans la banlieue de Changchun en Chine, ont été analysées par Wu Yin et al. [21]. Dans l'huile essentielle des tiges et des feuilles, soixante-six composés ont été identifiés, ce qui représente 98,12 % de la composition totale, parmi lesquelles le caryophyllène (17,24%), le  $\beta$ -myrcène (14,06%) et le *pi*-bicyclosesquiphellandrène (10,14%) sont les produits majoritaires. Dans l'huile essentielle des racines, trente-trois composés ont été identifiés, représentant 78,89 % de la composition totale, parmi lesquels le 1,2,4-méthèno-1Hcyclobuta[ $\beta$ ]cyclo (32,3%),  $\alpha$ -farnésène (17,1 %) et le caryophyllène (10,9 %) sont les produits majoritaires.

- ***Daucus. carota ssp maritimus***

La composition chimique des huiles essentielles des fleurs et des racines de *Daucus. carota ssp. maritimus* sous-espèce recueillies en Tunisie et étudiée pour la première fois par Jabrane et al. [7] [14] révèle la présence de six et trente-deux composés respectivement. Une différence remarquable a été observée de point de vue pourcentages constitutifs de ces deux organes. La composition chimique de l'huile essentielle des fleurs a été caractérisée par une grande proportion de monoterpènes hydrocarbonés (68,4%), le sabinène est le produit majoritaire (51,6%). L'autre fraction importante dans la composition de la même huile est représentée par les monoterpènes oxygénés dont le terpinen-4-ol (11,0%) comme composé prédominant. L'huile essentielle des racines présentait une composition complètement différente. Les dérivés phénoliques sont les composés majoritaires avec (76,3%) du total, le dillapiole (46,6%) et la myristicine (29,7%), étant les produits prédominant.

- ***Daucus. carota ssp maximus***

La seule étude concernant l'huile essentielle des fruits de *Daucus. carota ssp maximus* de l'Egypte [15] montre qu'elle est constituée de préisocalamendiol (17,9-32,7%) comme produit majoritaire, suivi de shyobunone (16,8-24,3%), et du  $\beta$ -cubebène (3,5-12,7%).

- ***Daucus. carota ssp gummifer***

Il existe une seule publication dans la littérature, à notre connaissance qui décrit la composition chimique de l'huile essentielle des fruits de cette sous espèce de l'Espagne [18]. Le géranyl acétate (51,74–76,95%) a été rapporté comme étant le produit majoritaire.

- *Daucus. carota ssp. halophilus*

Les rendements en huiles essentielles ont été de 0,4 % pour les fleurs en début de floraison et de 0,6 % à 1,0 % pour les ombelles mûres. D'une manière général, il y a une similitude entre la composition des huiles essentielles obtenues à partir de deux endroits différents de Sud du Portugal (Cabo de S.Vicente et de Arrifana) [19]. Par contre, il y a des différences importantes entre l'huile essentielle en fonction du stade de développement végétatif de la plante, en particulier dans les proportions des phénylpropanoïdes. Les échantillons obtenus à partir des fleurs sont essentiellement composés de monoterpènes hydrocarbonés (64,9-76,8%). Le sabinène (28,3-33,8%) étant le principal constituant, alors que les principaux composés de l'huile obtenue de graines mûres sont l'élémicine (26,0-31,0%) et le sabinène (27,6 -29,0%).

- *Daucus. carota ssp. carota*

Différents travaux sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Daucus. carota ssp. carota* ont été menés. La pluparts des huiles sont caractérisées par la présence de:  $\alpha$ -pinène (jusqu'à 51%), sabinène (jusqu'à 50%), géranyl acétate (jusqu'à 30%), élémicine (jusqu'à 20%), (E)-méthyle-isoeugénol (jusqu'à 35%), et carotol (jusqu'à 70%) [10,23-28]. L'huile essentielle des ombelles et des fleurs de *Daucus. carota ssp. carota* de Pologne été composée principalement par des hydrocarbures monoterpéniques (84.0 %), et les produits majoritaires sont  $\alpha$ -pinène (30.0-42.0 %), sabinène (19.5-40.5%) et le myrcène (2.5-7.0 %) [7,9]. La composition de l'huile essentielle des parties aériennes, comparées à trois stades de développement (stade végétatif, en pleine floraison, et ombelles mûrs), montre que les principaux composés de toutes les huiles sont  $\alpha$ -pinène (16.1-42.7%), sabinène (21.3-45.3%), myrcène (4.0-12.9 %) et le limonène (3.55-6.75%) [29]. Cependant, les huiles essentielles des feuilles, tiges et ombelle du *Daucus. carota* en provenance de la Corse ont été étudiées. L'analyse des fractions a conduit à l'identification de 69 composants. L'huile se composait principalement de phénylpropanoïdes (45,9%) et de monoterpènes hydrocarbonés (38,6 %), avec le (E) méthyle-isoeugénol (33,0 %),  $\alpha$ -pinène (24,9 %) et élémicine (11,4 %) comme produits majoritaires [8].



### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

**Tableau III.3:** Les composés majoritaire des huiles essentielles de *Daucus. carota* provenant de différentes origines rapportées dans la littérature

<i>D. carota. ssp.</i>	Organes	Origines	Composés majoritaires	Références
<i>maritimus</i>	Fleurs	Tunisie	sabinène (51.6%), terpinèn-4-ol (11.0%).	[14]
	Racines		myristicine (29.7%), dillapiole (46.6%).	
<i>maximus</i>	Fruits mures	Egypte	shyobunone (16.8-24.3%), β-cubebène (3.5-12.7%), préisocalamendiol (17.9-32.7%).	[15]
<i>sativus</i>	ombelles	Pologne	α-pinène(40.0- 46.0%), sabinène (12.0-24.0%), (E)-β-caryophyllène (4.6-13.2%).	[7]
	feuilles	Iran	<i>trans</i> -Anéthole (23.5 %), myrcène (14.5 %),	[16]
	Graines	Pologne	carotol (10.7-48.0%), α-pinène (9.0- 18.0%),	[9]
<i>gummifer</i>	Fruits	Suède	myrcène (25.7-44.6 %), (E)-β-ocimène (8.0-11.3%), méthyleisoeugénol (19.7-55.3%).	[17]
	Fruits	Espagne	géranyl acétate (51.74–76.95%).	[18]
<i>halophilus</i>	Fleurs	Portugal	sabinène (28.3-33.8%). limonène (11.0-11.8%)	[19]
	ombelles mures		élémicine (26.0–31.0%), sabinène (27.6–29.0%).	
<i>sativa</i>	Graines	Chine	β-bisabolène (80.49%), α-asarone (8.8%), and cis-α-bergamotène (5.51%).	[20]
	Tiges et feuilles	Chine	caryophyllène (17.24%), myrcène (14.06%), (+) epi-bicyclo-sesquiphellandréne (10.14%),	[21]
	Racines		α-farnesène (17.1%), caryophyllène (10.9%), 1, 2, 4-Méthano-1H-cyclobuta[ β] cyclo (32.3%).	
	ombelles	Italie	β-bisabolène (17.6-51.0%), carotol (2.4-25.1%), 11α-(H)-himachal-4-en-1-β-ol (9.0-21.6%), (E)-méthyle isoeugénol (1.3-10.0%).	[22]
		Portugal	α-pinéne (13.0-37.9%), géranyl acetate (15.0-65.0%).	

### *Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles*

<i>carota</i>	ombelles	Tunisie	elemicine (31.5-35.3%), carotol (48.0-55.7%), 11- $\alpha$ -(H)-himachal-4- $\acute{e}$ n-1- $\beta$ -ol (12.7-17.4%), sabinène (12.0-14.5%), $\alpha$ -selinène (7.4-8.6%).	[10]
	Tout	Serbie	$\alpha$ -pinène (7.1-51.2%), sabinène (2.7-36.7%).	[23]
	Fruits		muurolène (8.2-10.9%).	
	Graines	Turkie	carotol (68.0%), daucène (8.7%).	[24]
	Partie aériennes	Corse	$\alpha$ -pinène (15.9-24.9%), elemicine (11.4-16.3%), (E)-méthyle-isoeugénol (21.8-33.0%).	[8]
	Herbes, ombelles	Pologne	$\alpha$ -pinène (30.0-42.0 %), sabinène (19.5-40.5%), myrcène (2.5-7.0 %).	[7,9]
	Graines	Lithuanie	sabinène (28.2-37.5%), $\alpha$ -pinène (16.0-24.5%), terpinen-4-ol (4.6-7.5%), $\gamma$ -terpinène (2.9-6.0%).	[25]
	Racines		$\alpha$ -terpinolène (26-56 %).	
	Feuilles	Vienne	$\alpha$ -pinène (20.9-44.8%), sabinène (14.2-19.5%).	[26,27]
	Fruits		$\alpha$ -pinène (23.5-30.4%), sabinène (21.5-46.6%), géranyl acétate (3.9-28.1 %).	
Fruits	Serbie	sabinène (18.7%), carotol (20.3%).	[28]	
Herbes, ombelles	Pologne	$\alpha$ -pinène (16.1-42.7%), sabinène (21.3-45.3%), myrcène (4.0-12.9 %), limonène (3.55-6.75%).	[29]	

La présente recherche se concentre sur l'étude de la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes et des racines de la carotte cultivée récoltée dans huit différentes stations de l'Ouest Algérien.

Les résultats ont montré que *Daucus. carota ssp. sativus* cultivé en Algérie avait une variation considérable dans les rendements des huiles essentielles et la composition chimique en raison de l'origine du lieu de récolte.

Le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes aromatiques sont fortement influencés par l'emplacement de la culture, le stade de développement, les méthodes de récolte, le séchage après récolte et les conditions écologiques et climatiques [30]. En effet, notre étude a montré une variation significative dans le rendement des huiles essentielles de *Daucus. carota ssp. sativus*. L'analyse statistique regroupait les huiles essentielles des racines en deux groupes distincts liés à l'origine de la récolte. Le matériel végétal cultivés dans un climat sec et à haute altitude produisait des huiles essentielles avec une teneur importante en géranyl linalol et myristicine tandis que le matériel végétal cultivé dans un climat humide et à basse altitude produisait une teneur plus importante en géranyl linalol (jusqu'à 50%) dans l'huile essentielle. En revanche, il semble que les huiles essentielles des parties aériennes de *Daucus. carota ssp. sativus* étaient dominés par l'alismol quel que soit le type de climat.

En outre, la prévalence de géranyl linalol semble être positive du point de vue nutritionnel, puisque, ce composé a inhibé de façon significative la prolifération cellulaire dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines MCF-7, Ca Ski et HCT-116 de manière dose-dépendante [31]. Cependant, les huiles essentielles des racines obtenues à partir des huit stations étaient riches en géranyl linalol. Ce composé est un ingrédient de parfum utilisé dans les cosmétiques décoratifs et les parfums fins [32].

Dans ce travail, nous avons trouvé des différences significatives dans les rendements et la composition chimique des huiles essentielles de *Daucus. carota ssp. sativus*, recueillies à partir des huit stations. Il semble que la culture de racines *Daucus. carota ssp. sativus* dans les stations à basse altitude et avec un climat humide est utile pour accéder à un rendement élevé en huile essentielle et une plus grande quantité de géranyl linalol. D'autre part, il semble que les huiles essentielles des parties aériennes de *Daucus. carota ssp. sativus* n'étaient pas affectées par la nature des sols et le climat et étaient dominées par l'alismol et le spathulénol.

## **II.2. Compositions chimiques de l'extrait d'hydrolat des racines et de la partie aérienne du *Daucus. carota ssp. sativus*.**

Les hydrolats sont généralement associés aux procédés de distillation pour l'obtention d'huiles essentielles à partir de plantes aromatiques.

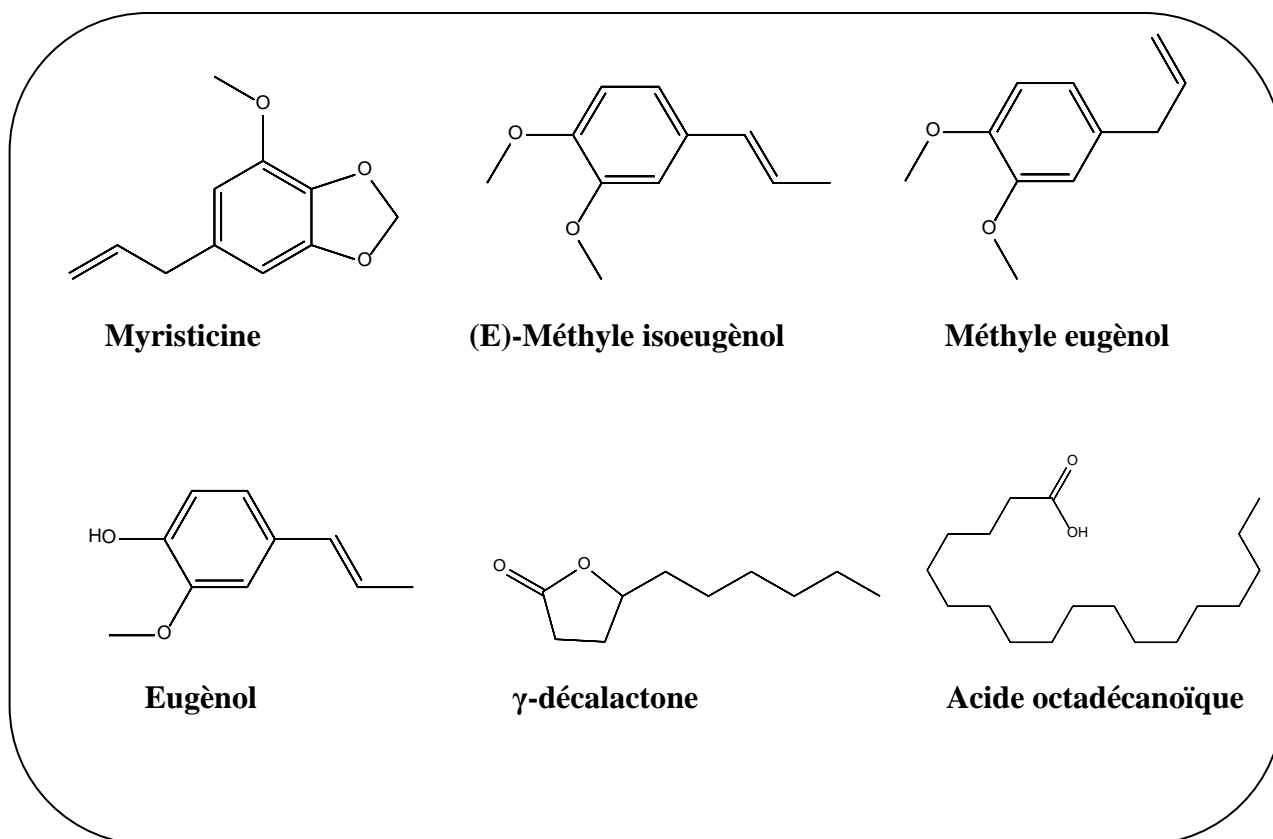
L'hydrolat comprend certains composés hydrosolubles de l'huile essentielle ainsi que d'autres composés végétaux. Les principaux composés sont généralement les mêmes que ceux présents dans la fraction oxygénée des huiles essentielles correspondantes [33]. La présence de certains composés d'huiles essentielles donne à l'hydrolat son parfum. Les hydrolats sont donc très parfumés, fortement aromatisés avec un pH de 4,5 à 5,5 [34].

En raison des propriétés biologiques et organoleptiques des hydrolats, ils ont été utilisés dans les industries alimentaires et cosmétiques. Selon certains auteurs, ils sont également utilisés dans l'agriculture biologique contre les champignons, la moisissure et les insectes et pour la fertilisation des sols [35].

Pour pouvoir effectuer l'analyse de la composition chimique des hydrolats par CPG-SM, il est nécessaire de « concentrer » l'hydrolat avant l'injection, en procédant à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique tel que le chloroforme ou l'éther diéthylique.

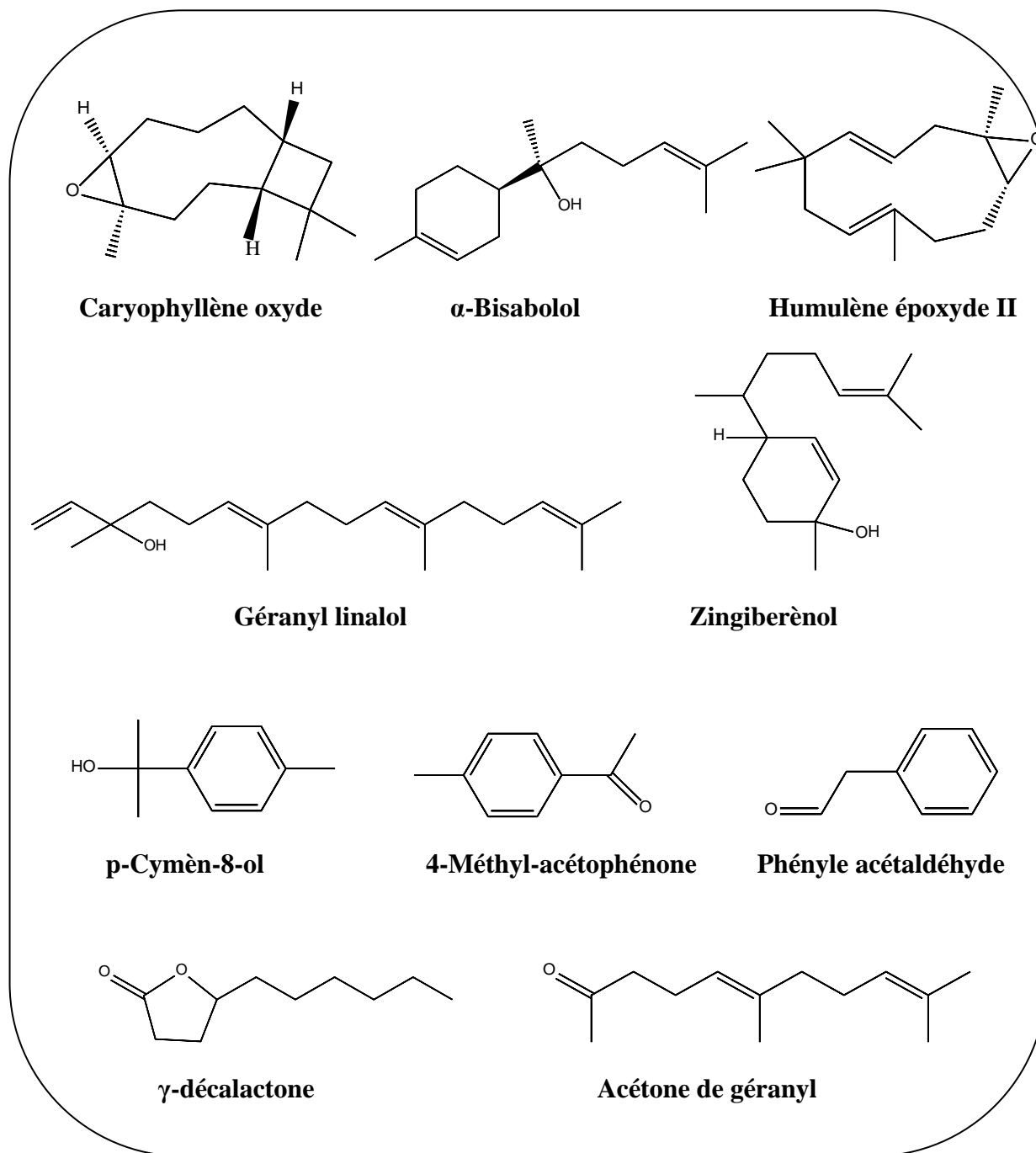
L'identification de la composition chimique de l'extrait d'hydrolat des racines et de la partie aérienne du *Daucus. carota ssp. sativus* par CPG et CPG-SM, nous a permis l'identification de trente-neuf composés dans les racines et quarante-trois composés dans les parties aériennes, avec des pourcentages variant de 93,3% et 98,3% respectivement de la composition chimique totale (**Tableau III.4**).

La composition chimique de l'extrait d'hydrolat des racines et des parties aériennes est très différente de la composition chimique de l'huile essentielle. En effet, l'extrait d'hydrolat de racines a été dominé principalement par les composés phénoliques (59,7%), comme la myristicine (17,8%) (**37**), le (E)-méthyle isoeugénol (16,6%) (**35**), le méthyle eugénol (11,9%) (**32**) et l'eugénol (7,9%) (**30**), suivie par des composés oxygénés, représentés par la gamma-décalactone (7,8%) (**33**) et l'acide octadécanoïque (6,3%) (**52**). Les structures chimiques des composés majoritaires de l'extrait d'hydrolat des racines sont représentées dans la **Figure III.5**.



**Figure III.5:** Composés majoritaires identifiés dans l'extrait de l'hydrolat des racines du *Daucus carota ssp. sativus*.

L'extrait d'hydrolat de la partie aérienne a été caractérisé par des composés oxygénés, des sesquiterpènes (38,3%), tels que l'oxyde de caryophyllène (9,8%) (**40**),  $\alpha$ -bisabolol (7,9%) (**48**), époxyde humulène II (6,6%) (**41**), géranyl linalol (5,6%) (**51**) et le zingiberénol2 (4,7%) (**44**). Les composés phénoliques ont été caractérisés par le p-cymèn-8-ol (8,9%) (**19**), 4-méthyl-acétophénone (5,6%) (**18**) et le phényle acétaldéhyde (3,6%) (**10**), tandis que les monoterpènes oxygénés sont représentés par le  $\gamma$ -décalactone (6,8%) (**33**) et le géranyl acétone (5,6%) (**34**) (**Tableau III.4**). Les structures chimiques des composés majoritaires de l'extrait de l'hydrolat des parties aériennes sont représentées dans la **Figure III.6**.



**Figure III.6:** Composés majoritaires identifiés dans l'extrait de l'hydrolat des parties aériennes du *Daucus carota ssp. sativus*.

Peu d'études, à ce jour, concernent la composition chimique de l'extrait d'hydrolat des *Daucus* sont signalés dans la littérature. La composition chimique de l'extrait d'hydrolat de l'espèce *Daucus muricatus* étudiée par M.E.A. Dib et coll [36], a été caractérisée par la présence des composés oxygénés (38 monoterpènes, 17 sesquiterpènes, 10 phénylpropanoïdes, 19 composés non terpéniques et 1 diterpène) et aucun hydrocarbure n'a été observé. La composition chimique a été caractérisée par sa richesse en monoterpènes (41,0 %), suivie par des phénylpropanoïdes (33,5%), des sesquiterpènes oxygénés (20,2%) et un aliphatique (16,0%).

Dans l'ensemble, les composés les plus abondants dans l'extrait de l'hydrolat des parties aériennes de cette espèce des *Daucus* sont le terpinène 4-ol (16,2%), thymol (10,7%), copaborneol (8,8%), chavicolacétate d'éthyle (8,3%), myristicine (6,7%), isocavicol isobutyrate (6,7%), trans-pinocarveol (5,2%), isocamendiol (3,8%), l' $\alpha$ -terpinéol (3,7%), cryptone (3,1%), undécane-2-one (2,8%), cisverbenol (2,6%) et du spathuléol (1,2%), suivie par le (E)-isochavicol 2-butyrate de méthyle (5,1%), de l'acide hexadécanoïque (3,4%), isophytol (3,3%), heptadécanoate de méthyle (3,1%), borneol (2,5%), tridécanoate de méthyle (1,6%), trans-p-mentha-2,8-diène-1-ol (1,5%), trans-carvéol (1,4 %), 3,4 diméthyl-5-pentyl- 5H-furan-2-one (1,4%) et le p-anisaldéhyde (1,1%).

D'autre part l'extrait d'hydrolat des racines a été caractérisé par le géraniol (3,7%), undécane-2-ol (3,2%),  $\alpha$ -cadinol (2,8%), l'ester diisobutylique (2,8%), verbénone (2,2 %), l'hydrate de cis-sabinène (1,6%), undécane-2-one (1,5%), trans-myrtanol (1.4%) et l'acétate de myrtényle (1.2%).

### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

**Tableau III.4:** Compositions chimiques des extraits d'hydrolat des racines et des parties aériennes du *Daucus. carota ssp. sativus*

N°	Composés <sup>a</sup>	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	Extraits d'hydrolat		Identification <sup>i</sup>
					Racines	Parties aériennes	
1	Héxanal	770	771	1048	0,3	0,2	RI, MS
2	Octane	800	796	802	0,1	-	RI, MS
3	(E)-2-Héxanal	832	830	1202	1,8	0,8	RI, MS
4	Héptanal	876	875	1185	0,3	0,2	RI, MS
5	Benzaldehyde	929	928	1525	0,9	0,9	RI, MS
6	Octén-3-one	956	956	1289	0,1	0,2	RI, MS
7	6-Méthyl-hept-5-én-2-one	966	960	1326	0,3	0,3	RI, MS
8	Octanal	980	977	1290	0,5	6,2	RI, MS
9	2-Pentylfurane	981	977	1350	Tr	-	RI, MS, Ref
10	Phénylacétaldehyde	1013	1009	1616	2,1	<b>3,6</b>	RI, MS
11	Acétophenone	1044	1036	1605	0,3	-	RI, MS
12	(E)-Linalol oxyde THF	1058	1052	1430	0,1	0,2	RI, MS
13	(Z)-Linalol oxyde THF	1073	1070	1440	0,2	0,6	RI, MS
14	Nonan-2-one	1074	1069	1385	0,1	0,5	RI, MS
15	Nonanal	1076	1081	1386	0,3	0,5	RI, MS
16	Linalool	1086	1083	1540	2,1	1,8	RI, MS
17	(E)-2-Nonenal	1136	1134	1520	0,9	0,6	RI, MS
18	4-méthyle-Acetophénone	1155	1154	1747	0,5	<b>5,6</b>	RI, MS
19	p-Cymèn-8-ol	1161	1161	1830	1,2	<b>8,9</b>	RI, MS
20	Terpinèn-4-ol	1164	1161	1598	2,1	1,2	RI, MS
21	$\alpha$ -Terpinèol	1176	1173	1699	0,8	-	RI, MS
22	Décanal	1180	1183	1491	0,1	-	RI, MS
23	$\beta$ -Cyclocitral	1195	1196	1610	0,3	-	RI, MS Ref
24	Thymyl méthyl oxyde	1215	1214	1585	-	0,2	RI, MS
25	trans-Chrysanthènyl acétate	1222	1219	1520	1,3	0,6	RI, MS
26	(E)-2-Décenal	1240	1237	1645	0,1	-	RI, MS



### *Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles*

27	Bornyl acétate	1270	1268	1570	0,8	1,1	RI, MS
28	2-Undecanone	1273	1272	1590	-	1,3	RI, MS
29	Carvacrol	1278	1282	2219	0,5	0,4	RI, MS
30	Eugèno	1330	1327	2171	<b>7,9</b>	0,8	RI, MS
31	(E)- $\beta$ -Damascenone	1363	1361	1779	0,3	0,2	RI, MS
32	Méthyle eugèno	1369	1373	2004	<b>11,9</b>	0,7	RI, MS
33	$\gamma$ -Dècalactone	1420	1430		<b>7,8</b>	<b>6,8</b>	RI, MS
34	Gèranyl acètone	1430	1428	1849	-	<b>5,6</b>	RI, MS
35	(E)-Méthyleisoeugèno	1463	1461	2175	<b>16,6</b>	3,1	RI, MS
36	$\beta$ -Ionone	1468	1464	1933	-	0,4	RI, MS
<b>37</b>	Myristicine 4-formyl-5-nor- $\beta$ - Caryophyllène	1489	1489	2185	<b>17,8</b>	0,5	<b>RI, MS</b>
38	Caryophyllène	1564	1565	1991	-	1,5	RI, MS
39	Spathulèno	1572	1569	2112	-	0,2	RI, MS
40	Caryophyllène oxyde	1578	1570	1937	-	<b>9,8</b>	RI, MS
41	Humulène époxyde II	1593	1592	2041	-	<b>6,6</b>	RI, MS
42	Ledol	1600	1601	2027	0,3	0,6	RI, MS
43	Zingiberèno 1	1599	1599	2109	-	0,3	RI, MS
44	Zingiberèno 2	1613	1612	2190	Tr	<b>4,7</b>	RI, MS
45	Alismol	1619	1614	2240	3,1	3,2	RI, MS Ref
46	$\alpha$ -Cadinol	1643	1641	2229	2,1	2,6	RI, MS
47	(Z,Z)-Farnesal	1655	1651	2163	1,1	-	RI, MS
48	$\alpha$ -Bisabolol	1673	1668	2215	-	<b>7,9</b>	RI, MS
49	(Z,E)-Farnesol	1694	1692	2330	-	0,6	RI, MS
50	(E,Z)-Farnesyl acètone	1871	1872	2335	-	0,3	RI, MS
51	Gèranyl linalol	2010	2019	2537	-	<b>5,6</b>	RI, MS
52	acide octadècanoique	2113	2103	2605	<b>6,3</b>	-	RI, MS Ref
<b>Taux d'identification %</b>					<b>93,3</b>	<b>98,3</b>	
<b>% Composés hydrocarbonés</b>					-	-	

### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

---

<b>% Composés oxygénés</b>	<b>93,3</b>	<b>98,5</b>
% Monoterpènes oxygénés	15,8	18,5
% Sesquiterpènes oxygénés	6,6	38,3
% Composés phénolique	59,7	25,1
% Diterpènes oxygénés	-	5,6
% Composés oxygénés non-terpéniques	11,2	10,8

---

<sup>a</sup>L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup>Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (*IRIa*) reportés par König et coll., 2001.

<sup>c</sup>Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (*RIa*).

<sup>d</sup>indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (*RIp*)

<sup>e</sup>HYcoll R: extrait d'hydrolat collectif des racines

<sup>h</sup>HY coll AP: extrait d'hydrolat collectif des parties aériennes

---

### **III. Composition chimique des huiles essentielles et de l'extrait d'hydrolat de *Marrubium vulgare***

#### **III.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare***

l'analyse par CPG et CPG-SM des échantillons de l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) du *Marrubium vulgare* récoltées dans les trois stations de Beni-Snous (S1), Tlemcen (S2) et Ain el Houtz (S3), obtenue par hydrodistillation nous a permis l'identification de 44 constituants qui représentent un pourcentage variant de 91,3 à 96,5% de la composition de l'huile essentielle totale. Leurs indices de rétention et leurs pourcentages relatif sont présentés dans le **Tableau III.5**

Bien que les trois huiles essentielles des parties aériennes présentent la même composition chimique, il y avait des différences significatives dans le pourcentage des principaux composants. Les sesquiterpènes hydrocarbonés étaient la classe prédominante des composés de huile essentielle de *Marrubium vulgare* avec un pourcentage allant de 72.9 à 65.5%, le E- $\beta$ -farnésène (6.3-22,9%) (**24**) était le principal composant. Son abondance relative était suivie par le E- $\beta$ -caryophyllène (14.9-20.3%) (**21**),  $\alpha$ -humulène (13,8-16.9%) (**25**),  $\beta$ -bisabolène (6.7-9.5%) (**30**),  $\delta$ -cadinène (1.9-5.1%) (**31**) et le caryophyllène oxyde (1.6-3.8%) (**33**), puis viennent les composés non-terpéniques qui représentaient 13 à 4.4%, comme le tétradécane (1.1-6.5%) (**20**) et les diterpènes oxygénés qui sont présents de 12.9 à 7% comme le (E)-phytol (0.8-8.8%) (**43**), et le (Z)-phytol (2.5-5.9%) (**41**). Les structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielle sont représentées dans la **Figure III.7**.

Seules quelques différences quantitatives sont notées par rapport aux études précédemment rapportées dans la majorité des publications traitant la composition chimique des huiles essentielles du *Marrubium vulgare*. De Lituanie, le (Z)-  $\beta$ -farnésène, le  $\beta$ -caryophyllène, (E)-2-hexenal, l' $\alpha$ -humulène et le germacrène D étaient les principaux constituants de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* [37]. De la République tchèque, les principaux constituants de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* étaient le  $\beta$ -caryophyllène (45,8%) et le germacrène D (14,4%) [38].

### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

**Tableau III.5:** Composition chimique des huiles essentielles des parties aériennes du *Marrubium vulgare*

N°	Composés <sup>a</sup>	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	Huile essentielle			Identification <sup>i</sup>
					S1	S2	S3	
1	Hexanal	770	771	1055	0,1	-	-	RI, MS
2	(E)-2-Hexenal	830	823	1213	0,5	-	-	RI, MS
3	$\alpha$ - Pinène	931	930	1015	-	-	0,2	RI, MS
4	Octen-3-one	956	953	1293	0,1	3,1	-	RI, MS
5	1-Octen-3-ol	959	960	1446	0,4		0,1	RI, MS
6	Myrcène	976	976	1159	tr	0,6	1,1	RI, MS
7	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1024	1010	1394	0,2	-	0,1	RI, MS
8	(E)- $\beta$ -Ocimène	1034	1031	1247	tr	-	tr	RI, MS
9	Nonanal	1083	1082	1394	0,1	-	tr	RI, MS
10	Linalool	1081	1085	1544	2,2	2,5	0,2	RI, MS
11	$\alpha$ -Thujone	1089	1098	1396	0,1	-	-	RI, MS
12	Décanal	1185	1185	1498	0,2	-	0,1	RI, MS
13	Undécanal	1256	1251	1603	0,1	1,5	tr	RI, MS
14	Theaspirane I	1293	1290	1480	0,1	-	0,2	RI, MS
15	Theaspirane II	1308	1304	1517	0,1	-	0,2	RI, MS
16	E- $\beta$ -Damascenone	1362	1361	1780	0,2	-	0,1	RI, MS
17	$\alpha$ -Copaène	1379	1376	1488	1,7	1,8	1,9	RI, MS
18	$\beta$ -Bourbonène	1385	1383	1515	0,4		0,7	RI, MS
19	$\beta$ -Elemène	1388	1387	1589	0,5	3,1	0,6	RI, MS
20	Tetradecane	1400	1401	1400	<b>1,1</b>	<b>4,5</b>	<b>6,5</b>	RI, MS
21	E- $\beta$ -Caryophyllène	1424	1420	1591	<b>20,3</b>	<b>14,9</b>	<b>17,8</b>	RI, MS
22	$\beta$ -Copaène	1431	1433	1581	0,5	-	0,3	RI, MS
23	Trans- $\alpha$ -Bergamotène	1432	1436	1580	0,8	-	0,2	RI, MS
24	E- $\beta$ -Farnesène	1448	1451	1665	<b>22,9</b>	<b>6,3</b>	<b>17,2</b>	RI, MS
25	$\alpha$ -Humulène	1456	1453	1665	<b>13,8</b>	<b>16,9</b>	<b>15,2</b>	RI, MS
26	$\beta$ -Ionone	1466	1465	1936	1,4	1,3	1,2	RI, MS
27	$\alpha$ -Curcumène	1471	1471	1769	0,3	-	0,4	RI, MS

### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

28	Germacrène-D	1480	1476	1704	<b>1,4</b>	<b>3,7</b>	<b>2,5</b>	RI, MS
29	Bicyclogermacrène	1494	1492	1727	0,2	-	0,1	RI, MS
30	$\beta$ -Bisabolène	1500	1503	1720	<b>7,8</b>	<b>9,5</b>	<b>6,7</b>	RI, MS
31	$\delta$ -Cadinène	1516	1516	1752	<b>2,3</b>	<b>5,1</b>	<b>1,9</b>	RI, MS
32	Spathulénol	1557	1567	2119	0,9	1,1	0,4	RI, MS
33	Caryophyllène oxyde	1576	1570	1980	<b>3,8</b>	<b>1,6</b>	<b>2,9</b>	RI, MS
34	Humulène époxyde II	1601	1594	2044	0,8	-	1,1	RI, MS
35	$\tau$ -Muurolol	1634	1635	2143	0,9	1,1	1,5	RI, MS
36	$\alpha$ -Cadinol	1645	1642	2231	0,6	1,1	0,9	RI, MS
37	Héptadécane	1700	1701	1700	0,4	-	0,1	RI, MS
38	Octadécane	1800	1801	1800	-	1,5	3,4	RI, MS
39	Nonadécane	1900	1901	1900	0,2	0,9	0,5	RI, MS
40	Géranyl linalol	2019	2013	2537	1,5	1,6	0,3	RI, MS
41	(Z)-Phytol	2080	2090	2572	0,3	<b>2,5</b>	<b>5,9</b>	RI, MS
42	Eicosane	2100	2101	2100	0,4	0,8	0,5	RI, MS
43	(E)-Phytol	2107	2117	2617	0,9	<b>8,8</b>	0,8	RI, MS
44	Pentacosane	2500	2499	2500	0,8	0,7	0,6	RI, MS
<b>Taux d'identification %</b>					<b>91,3</b>	<b>96,5</b>	<b>94,4</b>	
% Monoterpènes hydrocarbonés					0.2	0.6	1.4	
% Monoterpènes Oxygénés					4.1	3.8	1.9	
% Sesquiterpènes hydrocarbonés					72.9	61.3	65.5	
% Sesquiterpènes oxygénés					7.0	4.9	6.8	
% Diterpènes oxygénés					2.7	12.9	7.0	
% Composés non-terpéniques					4.4	13.0	11.8	

<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

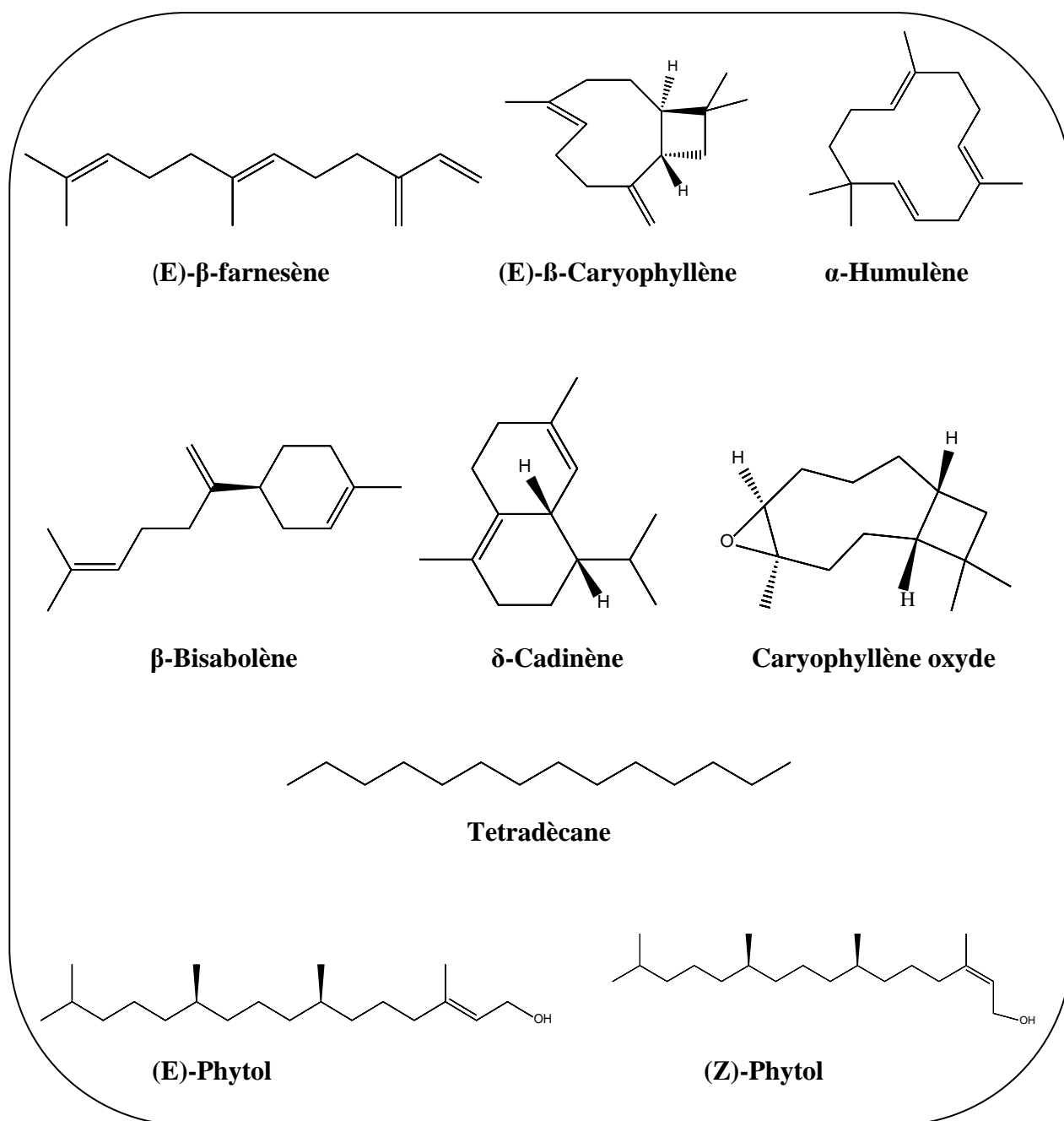
<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRIa) reportés par König et coll., 2001.

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup> Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp).

<sup>e</sup> Stations: Beni-Snous (S1), Tlemcen (S2), Ain el Houtz (S3)

Dans l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* de différentes régions de l'Iran, les principaux sont, le  $\beta$ -bisabolène (25,4%), le  $\beta$ -caryophyllène (11,6%), le germacrène D (9,7%) et le E-  $\beta$ -farnésène (8,3%) [39], le  $\beta$ -bisabolène (20,4%),  $\delta$ -cadinène (19,1%) et l'isocaryophyllène (14,1%) [40] et l'oxyde de caryophyllène (18,7%), le  $\beta$ -caryophyllène (12,8%) et le germacrène D (10,0%) [41].



**Figure III.7:** Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*

Par contre notre huile essentielle présente une différence originale de point de vue composition, avec celle de l'Egypte dont les principaux composés étaient le tricyclène, le  $\beta$ -pinène, le bisabolol, l' $\beta$ -élemone et l'isomenthon-8-thiol [42], de Tunisie les composés majoritaires sont le  $\gamma$ -eudesmol (11,93%),  $\beta$ -citronellol (9,90%), citronellyl formate (9,50%) et germacrène D (9,37%) [43], et celle d'autre régions de l'Algérie dont les principaux constituants de *Marrubium vulgare* étaient le 4,8,12,16-tétraméthyl heptadécane-4-olide (16,97%), le germacrène D-4-ol (9,61%), l' $\alpha$ -pinène (9,37%), phytol (4,87%), hydro-sabina cétone (4,12%), piperitone (3,27%),  $\delta$ -cadinène (3,13%), 1-octène-3-ol (2,35%) et benzaldéhyde (2,31%) [44].

#### **III.2. Effet du cycle végétatif sur le rendement et la composition de l'huile essentielle**

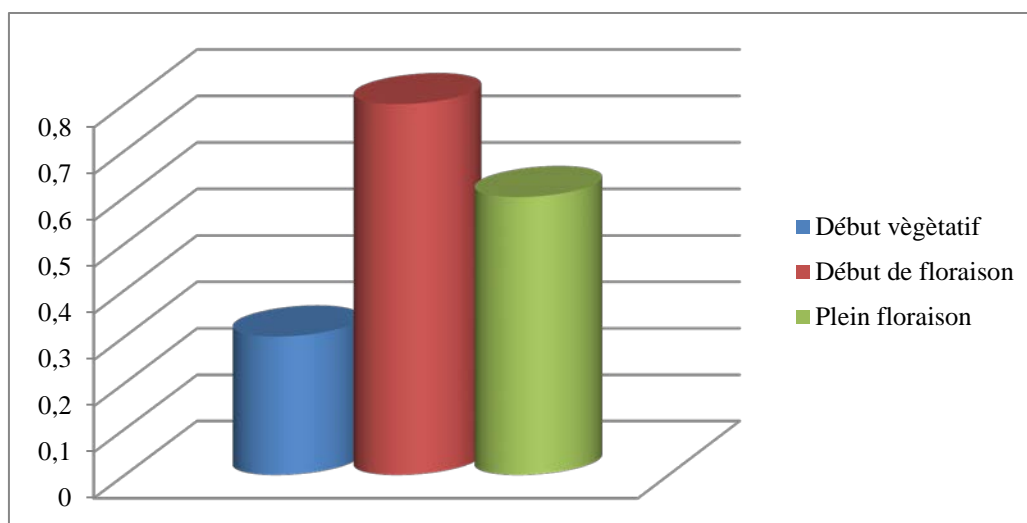
D'après la littérature, peu de travaux ont été consacrés à l'étude de variabilité chimique des huiles essentielles de *Marrubium vulgare*. Le présent travail a pour objectif principal d'étudier la variabilité chimique des huiles essentielles de *Marrubium vulgare* en fonction du cycle de développement de la plante. Pour cela nous avons analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/SM l'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes de la station de Beni-Snous (Tlemcen) durant les trois stades végétatifs de la plante: stade végétatif (fin Mars), stade de floraison (Avril) et stade pleine floraison (à la fin du mois de Juin).

De nombreux facteurs influencent la composition chimique des huiles essentielles, tels que le facteur génétique, les stades végétatifs, la localisation, et le degré de maturité.

En effet, les travaux antérieurs ont montré qu'au cours de l'ontogenèse un certains nombres de transformations se produisent, révélées par les changements et la variabilité des processus physiologiques et morphologiques [45].

##### **III.2.1. Caractérisation chimique**

La variation du rendement en huile essentielle des parties aériennes du *Marrubium vulgare* en fonction des trois stades de croissance sont illustrés sur l'histogramme ci-dessous.



**Figure III.8:** Variation du rendement en huile essentielle des parties aériennes de *Marrubium vulgare* au cours des trois stades végétatifs

Nous avons observé un changement important dans le rendement en huile essentielle au cours des trois stades de croissance.

En effet un changement significatif dans le rendement en huile essentielle a été observé pendant les différents stades de croissance. L'huile essentielle a été obtenue avec des rendements de 0,3-0,8% (p/p). Le plus haut rendement en huile a été obtenu respectivement en Avril (début du stade de la floraison) et Juin (stade de la pleine floraison) avec 0,8 et 0,6% (p/p). La plus faible quantité d'huile essentielle était obtenue en Février (début du cycle végétatif) avec 0,3% (p/p) (**Figure III.8**).

Cette variation du rendement est due à plusieurs facteurs, tels que les facteurs génétiques, le stade végétatif, la méthode d'extraction et les conditions pédoclimatiques [46,47].

De même le rendement en huile au cours de la croissance de la plante est particulièrement sensible aux conditions environnementales (la lumière, la disponibilité des nutriments, et la longueur du jour) [48,49].



**III.2.2. Composition chimique de l'huile essentielle durant le cycle végétatif**

La composition chimique de huile essentielle provenant de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* récoltée en hiver (Février), le printemps (Avril) et de l'été (Juin 2014) dans la région de Beni-Snous a été étudiée par analyse CPG et CPG-SM (**Tableau III.6**).

### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

**Tableau III.6:** Compositions chimiques des huiles essentielles du *Marrubium vulgare* au cours des trois stades de développement

N°	Composés <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	Huile essentielle						Identification <sup>f</sup>
					Février		Avril		Juin		
					E1	E2	E3	E4	E5	E6	
1	Héxanal	770	771	1055	-	-	-	-	0.1	0.1	RI-MS
2	(E)-2-Héxanal	830	823	1213	-	-	-	-	0.5	0.3	RI-MS
3	Octèn-3-one	956	953	1293	-	-	-	-	0.1	0.1	RI-MS
4	1-Octèn-3-ol	959	960	1446	3.5	1.9	3.1	3.5	0.1	0.6	RI-MS
5	Myrcène	976	976	1159	-	-	1.2	1.3	0.1	0.1	RI-MS
6	(Z)- $\beta$ -Ocimène	1024	1010	1394	0.5	0.3	-	-	0.1	0.1	RI-MS
7	(E)- $\beta$ -Ocimène	1034	1031	1247	Tr	Tr	-	-	0.1	0.1	RI-MS
8	Nonanal	1083	1082	1394	1.4	1.5	-	0.2	0.1	0.1	RI-MS
9	Linalol	1081	1085	1544	1.1	1.3	0.7	0.2	2.2	0.2	RI-MS
10	$\alpha$ -Thujone	1089	1098	1396	0.6	0.4	-	-	0.1	0.1	RI-MS
11	Decanal	1185	1185	1498	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	RI-MS
12	Undecanal	1256	1251	1603	0.5	0.2	0.1	Tr	0.1	0.1	RI-MS
13	Theaspirane I	1293	1290	1480	0.2	0.3	0.1	Tr	0.1	0.1	RI-MS
14	Theaspirane II	1308	1304	1517	0.2	1.2	-	-	0.1	0.1	RI-MS
15	E- $\beta$ -Damascenone	1362	1361	1780	0.6	0.5	0.1	Tr	0.1	0.1	RI-MS
16	$\alpha$ -Copaène	1379	1376	1488	0.2	0.6	1.7	1.2	1.7	1.6	RI-MS
17	$\beta$ -Bourbonène	1385	1383	1515	0.4	0.3	0.5	0.3	0.4	0.5	RI-MS
18	$\beta$ -Elemène	1388	1387	1589	0.3	0.6	0.4	0.3	0.5	0.2	RI-MS
19	Tetradécane	1400	1401	1400	0.2	0.2	0.2	0.2	1.1	0.6	RI-MS
20	E- $\beta$ -Caryophyllène	1424	1420	<b>1591</b>	<b>5.3</b>	<b>4.8</b>	<b>11.2</b>	<b>7.9</b>	<b>20.3</b>	<b>23.5</b>	RI-MS
21	$\beta$ -Copaène	1431	1433	1581	0.5	0.4	0.4	0.3	0.5	0.3	RI-MS
22	Trans- $\alpha$ -Bergamotène	1432	1436	<b>1580</b>	0.2	0.4	0.2	0.1	0.4	0.1	RI-MS
23	E- $\beta$ -Farnesène	1448	1451	<b>1665</b>	<b>3.4</b>	<b>5.7</b>	<b>15.3</b>	<b>15.7</b>	<b>22.9</b>	<b>21.0</b>	RI-MS
24	$\alpha$ -Humulène	1456	1453	<b>1665</b>	<b>Tr</b>	<b>Tr</b>	<b>12.9</b>	<b>11.8</b>	<b>13.3</b>	<b>14.8</b>	RI-MS
25	$\beta$ -Ionone	1466	1465	<b>1936</b>	4.5	5.3	0.7	0.7	1.4	0.1	RI-MS
26	$\alpha$ -Curcumène	1471	1471	<b>1769</b>	1.2	1.6	0.3	0.1	0.3	1.1	RI-MS

### *Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles*

27	Germacrène-D	1480	1476	1704	1.1	1.3	0.2	2.3	2.4	1.4	RI-MS
28	Bicyclogermacrène	1494	1492	1727	0.3	0.2	0.1	0.4	0.2	0.2	RI-MS
29	$\beta$ -Bisabolène	1500	1503	1720	2.5	2.6	10.2	11.1	7.6	8.9	RI-MS
30	$\delta$ -Cadinène	1516	1516	1752	1.2	1.2	2.5	1.9	2.3	2.1	RI-MS
31	Spathulenol	1557	1567	2119	0.1	0.3	0.9	0.5	0.9	0.1	RI-MS
	Oxyde de										RI-MS
32	caryophyllène	1576	1570	1980	7.2	5.6	4.5	5.6	5.2	6.4	
33	Humulène époxyde II	1601	1594	2044	1.5	1.2	0.7	0.4	0.8	0.4	RI-MS
34	$\tau$ -Muurolol	1634	1635	2143	2.6	3.3	0.6	0.4	0.9	0.4	RI-MS
35	$\alpha$ -Cadinol	1645	1642	2231	6.8	7.2	0.4	0.1	0.6	0.3	RI-MS
36	$\beta$ -Bisabolol	1653	1646	2140	1.3	1.8	0.7	Tr	Tr	0.4	RI-MS
37	$\alpha$ -Bisabolol	1672	1674	2217	0.6	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	RI-MS
38	Heptadécane	1700	1701	1700	1.5	1.3	0.3	0.5	0.4	0.4	RI-MS
39	Nonadécane	1900	1901	1900	1.4	1.6	0.4	0.6	0.2	0.1	RI-MS
40	Géranyl linalol	2019	2013	2537	1.6	1.1	4.7	2.3	1.5	1.4	RI-MS
41	(Z)-Phytol	2080	2090	2572	1.4	1.5	0.2	0.7	0.3	0.1	RI-MS
42	Eicosane	2100	2101	2100	1.2	1.3	0.6	0.6	0.1	0.4	RI-MS
43	(E)-Phytol	2107	2117	2617	<b>11.4</b>	<b>10.9</b>	<b>10.1</b>	<b>12.5</b>	<b>1.9</b>	<b>1.6</b>	RI-MS
44	Tricosane	2300	2300	2300	<b>23.1</b>	<b>20.5</b>	<b>4.2</b>	<b>6.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.4</b>	RI-MS
<b>%Taux d'identification</b>					<b>91.9</b>	<b>90.8</b>	<b>90.7</b>	<b>90.4</b>	<b>92.8</b>	<b>91.5</b>	
<b>% Rendements</b>					<b>0.3</b>	<b>0.29</b>	<b>0.78</b>	<b>0.8</b>	<b>0.58</b>	<b>0.6</b>	
% Monoterpènes hydrocarbonés					0.5	0.3	1.2	1.3	0.3	0.3	
% Monoterpènes Oxygénés					1.7	1.7	0.7	0.2	2.3	0.3	
% Sesquiterpènes hydrocarbonés					<b>22.1</b>	<b>27.0</b>	<b>56.8</b>	<b>54.1</b>	<b>74.5</b>	<b>76.1</b>	
% Sesquiterpènes oxygénés					<b>20.1</b>	<b>19.5</b>	<b>8.0</b>	<b>7.1</b>	<b>8.5</b>	<b>8.3</b>	
% Diterpènes oxygénés					<b>14.4</b>	<b>13.5</b>	<b>15.0</b>	<b>15.5</b>	<b>3.7</b>	<b>3.1</b>	
% Composés oxygénés non-terpénique					5.7	3.9	3.3	3.8	1.2	1.5	
% Composés non-terpéniques					<b>27.4</b>	<b>24.9</b>	<b>5.7</b>	<b>8.4</b>	<b>2.3</b>	<b>1.9</b>	

<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1);

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) reportés par König et coll., 2001.

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup> indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp).

<sup>e</sup> Station: région de Beni-Snous

Quarante-quatre composés représentant 90,4-92,8% de la composition chimique totale ont été identifiés. La composition chimique de l'huile essentielle obtenue au cours des trois stades était qualitativement identique.

Au cours du mois de Février: **début du cycle végétatif**, l'huile a été caractérisée par la présence de 39 composés représentant 91,9% et 90,8% de la composition chimique totale, les composés non terpéniques (aliphatiques), les diterpènes oxygénés et les sesquiterpènes ont été les plus abondants et leurs principaux composants étaient le tricosane (20,5-23,1%) (**44**), le (E)-phytol (10,9-11,4%) (**43**), le  $\alpha$ -cadinol (6,8-7,2%) (**35**) et l'oxyde de caryophyllène (5,6-7,2%) (**32**).

Au cours du mois d'Avril: **début du stade de la floraison**, la fraction des sesquiterpènes et de diterpènes oxygénés était la plus abondante; représentant respectivement un pourcentage de 54,1 à 56,8% et 15,0 à 15,5%, dont les principaux constituants étaient le E- $\beta$ -farnesène (15,3-15,7%) (**23**),  $\alpha$ -humulène (11,8-12,9%) (**24**), le (E)-phytol (10,1-12,5%) (**43**), le  $\beta$ -bisabolène (10,2-11,1%) (**29**) et le E- $\beta$ -caryophyllène (7,9-11,2%) (**20**).

Cependant, en mois de Juin: **stade de la pleine floraison**, l'huile essentielle été principalement constituée par des sesquiterpènes hydrocarbonés représentés par le (E)- $\beta$ -caryophyllène (20,3-23,5%) (**20**), le E- $\beta$ -farnesène (21,0-22,9%) (**23**),  $\alpha$ -humulène (13,3-14,8%) (**24**) et le  $\beta$ -bisabolène (7,6-8,9%) (**29**). D'autre part, les autres fractions sont moins abondantes (**Tableau III.6**).

Une comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* entre les trois stades de croissance, montre des différences significatives. Les sesquiterpènes hydrocarbonés étaient les composants les plus abondants identifiés dans la partie aérienne des trois huiles essentielles. Le taux de E- $\beta$ -caryophyllène, du E- $\beta$ -farnesène et de  $\alpha$ -humulène a significativement augmenté du début du cycle végétatif par rapport à la période de la pleine floraison qui été 4,8 à 23,5%, 3,4-22,9% et 11,8-14,8% respectivement.

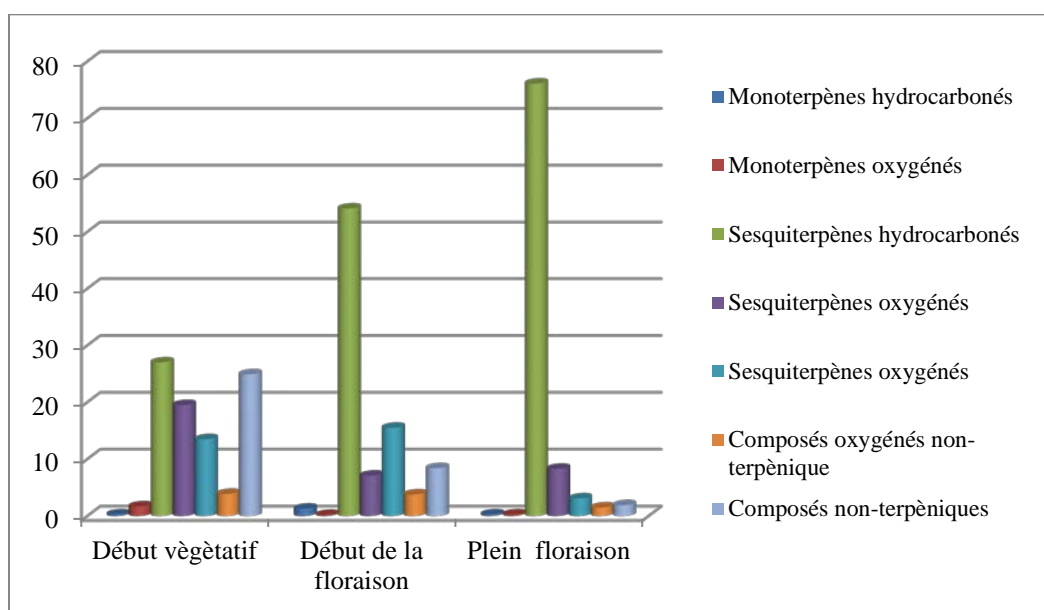
Dans la période de la pleine floraison la fraction des sesquiterpènes oxygénés a diminué, principalement en raison d'une diminution du pourcentage de  $\alpha$ -cadinol.

De même, pendant la même période, les composés non terpéniques et les diterpènes oxygénés ont diminué, principalement en raison d'une diminution des pourcentages de tricosane et de (E)-phytol, respectivement.

Selon nos résultats, il semble que la composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* ait varié significativement avec le stade physiologique de la plante. Le long de la vie

végétale de la plante, *Marrubium vulgare* produit trois huiles essentielles qui diffèrent par le pourcentage de leur classe de composés (**Figure III.9**).

Si on se réfère à la littérature, les monoterpènes et les sesquiterpènes sont généralement les principaux groupes de composés présents dans les huiles essentielles et qui peuvent être influencés par des changements saisonniers [50,51]. La composition chimique des huiles essentielles de *Marrubium vulgare* a été largement étudiée; selon les origines géographiques et botaniques des échantillons. Généralement, dans la plupart des huiles de ce genre, les sesquiterpènes ont été rapportés comme classes principales de composants [37-39,40,43].



**Figure III.9:** Pourcentage de la variation des principales classes de composés du *Marrubium vulgare* en fonction des trois stades de croissances

#### III.3. Composition chimique de l'extrait d'hydrolat de *Marrubium vulgare*

À l'issue du processus d'extraction de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* par entraînement à la vapeur d'eau, un litre d'hydrolat est récupéré. Pour extraire les composés dissous dans l'eau, des extractions liquide-liquide successives avec de l'éther diéthylique (3x100 mL) à température ambiante ont été effectuées. Après séchage sur du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, filtration puis évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient ainsi un extrait huileux qui a été analysé par

### Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles

chromatographie en phase gazeuse (IR) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de gaz (MS). Au total, 13 composés ont été identifiés (**Tableau III.7**). L'hydrolat possède une odeur très forte et il est d'aspect huileux visqueux.

**Tableau III.7:** Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat du *Marrubium vulgare*

N°	Composés	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	HY <sup>e</sup>	Identification <sup>f</sup>
1	Héxanal	770	771	1055	0,1	RI, MS
2	(E)-2-Héxenal	830	823	1213	0,5	RI, MS
3	Octen-3-one	956	953	1293	1,2	RI, MS
4	1-Octen-3-ol	959	960	1446	1,5	RI, MS
5	Linalol	1081	1085	1544	<b>6,5</b>	RI, MS
6	Méthyle eugénol	1369	1371	2008	<b>65,5</b>	RI, MS
7	Caryophyllène oxyde	1576	1570	1980	<b>6,2</b>	RI, MS
8	Humulène époxyde II	1601	1594	2044	<b>12,5</b>	RI, MS
9	$\tau$ -Muurolol	1634	1635	2143	0,9	RI, MS
10	$\alpha$ -Cadinol	1645	1642	2231	0,6	RI, MS
11	$\alpha$ -Bisabolol	1672	1674	2217	0,1	RI, MS
12	(Z)-Phytol	2080	2090	2572	0,3	RI, MS
13	(E)-Phytol	2107	2117	2617	0,5	RI, MS
<b>Total %</b>					<b>96,4</b>	
Monoterpènes oxygénés					72.0	
Sesquiterpènes oxygénés					20.3	
Diterpènes oxygénés					0.8	
Composés non-terpéniques					3.3	

<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) reportés par König et coll., 2001.

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

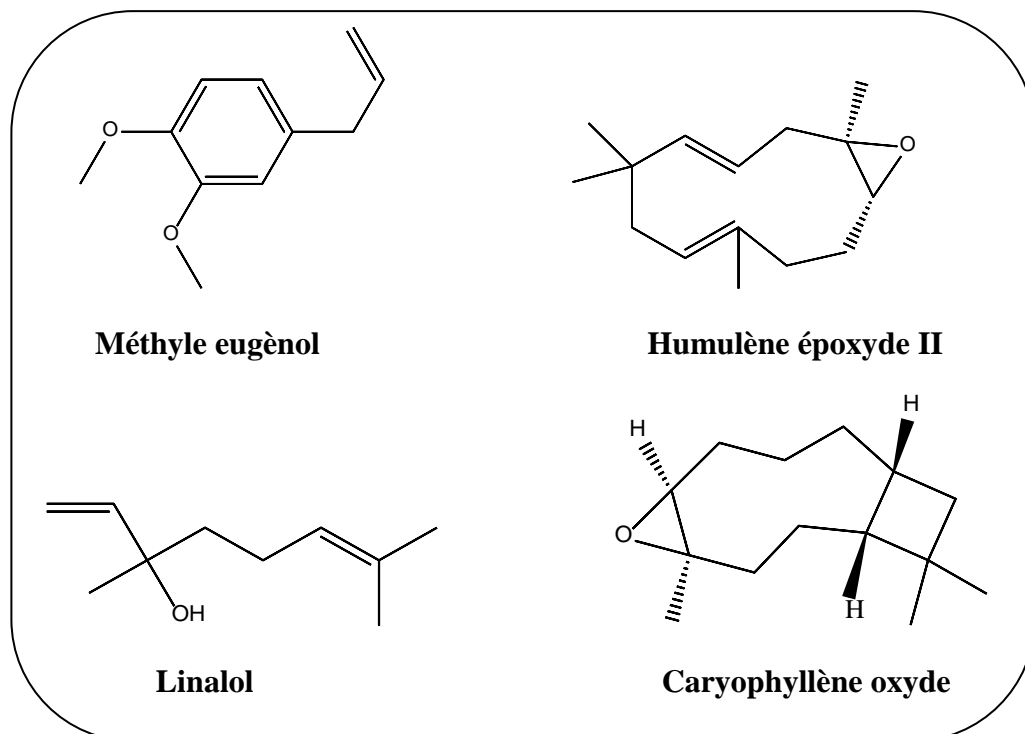
<sup>d</sup> indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (Rip).

La composition de l'extrait de l'hydrolat du *Marrubium vulgare* est très différente de celle de l'huile essentielle correspondante. Il y a en effet bien plus de monoterpènes oxygénés (72.0% contre 4.1% dans l'huile essentielle), des sesquiterpènes oxygénés (20.3% contre 7.0% dans l'huile), et absence des sesquiterpènes hydrocarbonés.

Le composé majoritaire est le méthyle eugénol (65.5%) (**6**), suivi de l'humulène époxyde II (12.5%) (**8**), du linalol (6.5%) (**5**) et du caryophyllène oxyde (6,2 %) (**7**).

Certains composés de l'huile essentielle se retrouvent dans l'hydrolat comme octen-3-one (1.2%) (3), 1-octèn-3-ol(1.5%) (4),  $\tau$ -muurolol (0.9%) (9),  $\alpha$ -cadinol (0.6%) (10), (E)-2-hexenal (0.5%) (2), et le (Z)-phytol (0.3%) (12).

Les structures chimiques des composés majoritaires de l'extrait de l'hydrolat sont représentées dans la **Figure III.10**.



**Figure III.10:** Composés majoritaires identifiés dans l'extrait de l'hydrolat de *Marrubium vulgare*

#### **IV. Huiles essentielles et extrait de l'hydrolat de *Ballota nigra***

L'étude bibliographique minutieuse menée sur les espèces de *Ballota nigra*, révèle que cette plante a fait l'objet de quelques études. Ceci nous a incités à nous intéresser de près à l'étude de la composition chimique de son huile essentielle.

#### IV.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Ballota nigra*

Après extraction de l'huile essentielle des parties aériennes par hydrodistillation, le rendement en huiles essentielles a été de 0,9 %, la composition de l'huile essentielle a été analysée par CPG et CPG-SM. Le mode opératoire est détaillé dans la partie, **matériels et méthodes**. Les résultats sont donnés dans le **Tableau III.8**.

34 composés organiques volatils ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Ballota nigra*, représentant 87.7% de la composition chimique totale. Leurs indices de rétention et de leurs pourcentages relatifs sont présentés dans le **Tableau III.8**.

L'identification de ces composés est réalisée en comparant leurs spectres de masse (SM) et leurs indices de rétention avec ceux de la bibliothèque « Arômes » propre au laboratoire de Corse (France).

Les principaux composés chimiques qui constituent la fraction majoritaire de l'huile essentielle du *Ballota nigra*, obtenue à partir de l'hydrodistillation des tiges et de feuilles (**Tableau III.8**), sont le  $\beta$ -bisabolène (22.9%) (**19**), le caryophyllène oxyde (12.5%) (**23**), le germacrène-D (8.5%) (**18**), le E- $\beta$ -farnesène (8.2%) (**14**), et le (E)- $\beta$ -caryophyllène (7.9%) (**11**).

Les structures chimiques de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle sont représentées dans la **Figure III.11**.

La composition de huile essentielle des parties aériennes de *Ballota nigra* étudié était différente de ceux des autres origines, dans *Ballota. nigra ssp. Anatolique*, les principaux composants étaient le germacrène D (18,1%), l'acétate de nérolidol-époxy (15,4%), l'oxyde de sclaréol (12,1%), l'acétate de linalyle (11,5%) et le caryophyllène (10,5%) [52]. Alors que dans *Ballota. nigra ssp. Foetida*, le caryophyllène (25,1%) et germacrène D (24,2%) étaient les composés principaux [53].

L'huile essentielle de *Ballota nigra* de Kurdia est caractérisée majoritairement par la présence de l'oxyde de caryophyllène (39,43%), le trans-caryophyllène (24,88%), le germacrène D (7,64%), le 1-undécène (4,20%), l'époxyde d'isoaromadendrène (3,25%), et le tridécane-1 (2,81%) [54].

Tandis que dans *Ballota nigra* du nord de l'Iran, les principales composantes de l'huile essentielle étaient l'oxyde de caryophyllène (7,9%), l'épi-muurolol (6,6%),  $\delta$ -cadinène (6,5%) et  $\alpha$ -cadinol (6,3%) [55].



**Tableau III.8:** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *Ballota nigra*

N <sup>o</sup> <sup>a</sup>	Composés	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	HE <sup>e</sup>	Identification <sup>f</sup>
1	Octèn-3-one	956	953	1293	0,2	RI, MS
2	1-Octèn-3-ol	959	960	1446	0,4	RI, MS
3	Myrcène	976	976	1159	0,1	RI, MS
4	Linalool	1081	1085	1544	0,2	RI, MS
5	Decanal	1185	1185	1498	0,1	RI, MS
6	E-β-Damascenone	1362	1361	1780	0,1	RI, MS
7	α-Copaène	1379	1376	1488	1,2	RI, MS
8	β-Bourbonène	1385	1383	1515	0,4	RI, MS
9	β-Elemène	1388	1387	1589	0,3	RI, MS
10	Tetradecane	1400	1401	1400	0,2	RI, MS
11	E-β-Caryophyllène	1424	1420	1591	<b>7,9</b>	RI, MS
12	β-Copaène	1431	1433	1581	0,3	RI, MS
13	Trans-α-Bergamotène	1432	1436	1580	0,1	RI, MS
14	E-β-Farnesène	1448	1451	1665	<b>8,2</b>	RI, MS
15	α-Humulène	1456	1453	1665	0,1	RI, MS
16	β-Ionone	1466	1465	1936	0,7	RI, MS
17	α-Curcumène	1471	1471	1769	0,1	RI, MS
18	Germacrène-D	1480	1476	1704	<b>8,5</b>	RI, MS
19	Bicyclogermacrène	1494	1492	1727	0,4	RI, MS
20	β-Bisabolène	1500	1503	1720	<b>22,9</b>	RI, MS
21	δ-Cadinène	1516	1516	1752	1,9	RI, MS
22	Spathulénol	1557	1567	2119	0,5	RI, MS
23	Caryophyllène oxyde	1576	1570	1980	<b>12,5</b>	RI, MS
24	Humulène époxyde II	1601	1594	2044	0,4	RI, MS
25	τ-Muurolol	1634	1635	2143	0,4	RI, MS
26	α-Cadinol	1645	1642	2231	0,1	RI, MS
27	β-Bisabolol	1653	1646	2140	0,1	RI, MS
28	α-Bisabolol	1672	1674	2217	0,1	RI, MS
29	Nonadécane	1900	1901	1900	0,6	RI, MS
30	Géranyllinalool	2019	2013	2537	2,3	RI, MS
31	(Z)-Phytol	2080	2090	2572	3,7	RI, MS
32	Eicosane	2100	2101	2100	0,6	RI, MS
33	(E)-Phytol	2107	2117	2617	5,6	RI, MS
34	Pentacosane	2500	2499	2500	6,5	RI, MS
<b>Total %</b>					<b>87,7</b>	
Monoterpènes hydrocarbonés					0.1	
Monoterpènes oxygénés					0.2	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					53.1	
Sesquiterpènes oxygénés					14.1	

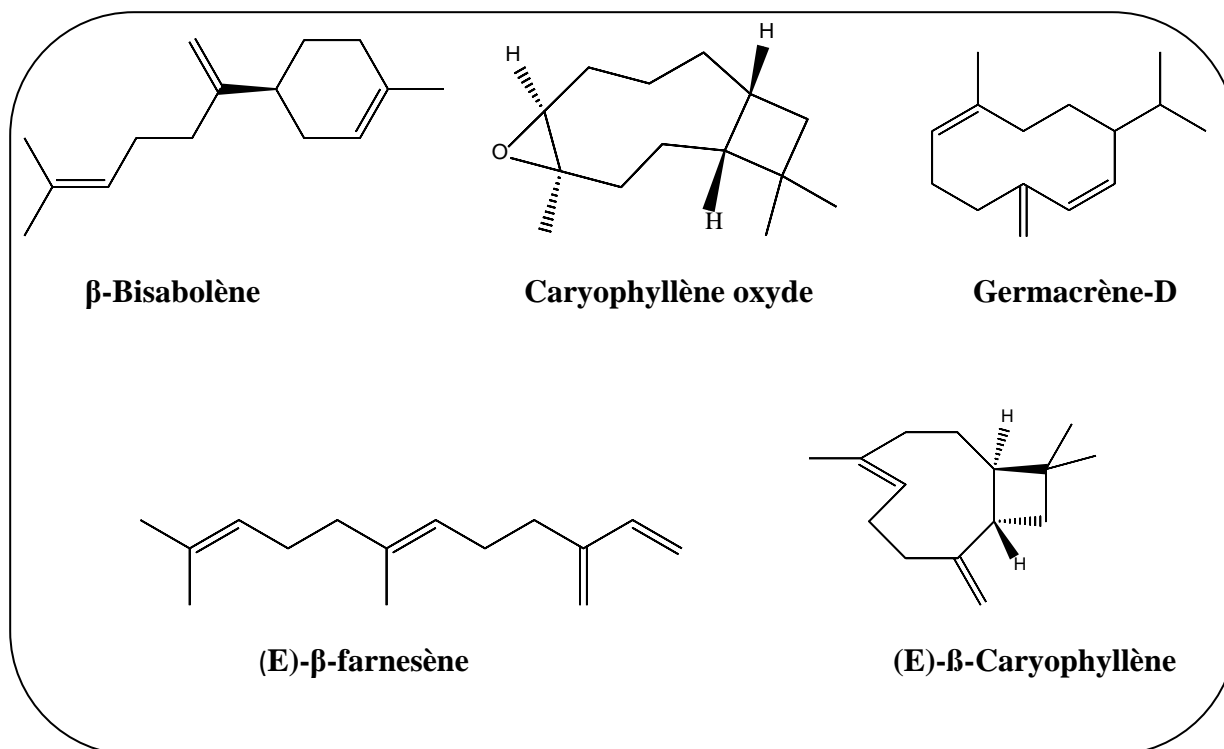
Diterpènes oxygénés	11.6
Composés non-terpéniques	8.6

<sup>a</sup>L'ordre de l'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup>Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) reportés par König et coll., 2001.

<sup>c</sup>Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).

<sup>d</sup>indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp).



**Figure III.11:** Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *Ballota nigra*

#### IV.2. Composition chimique de l'extrait d'hydrolat de *Ballota nigra*

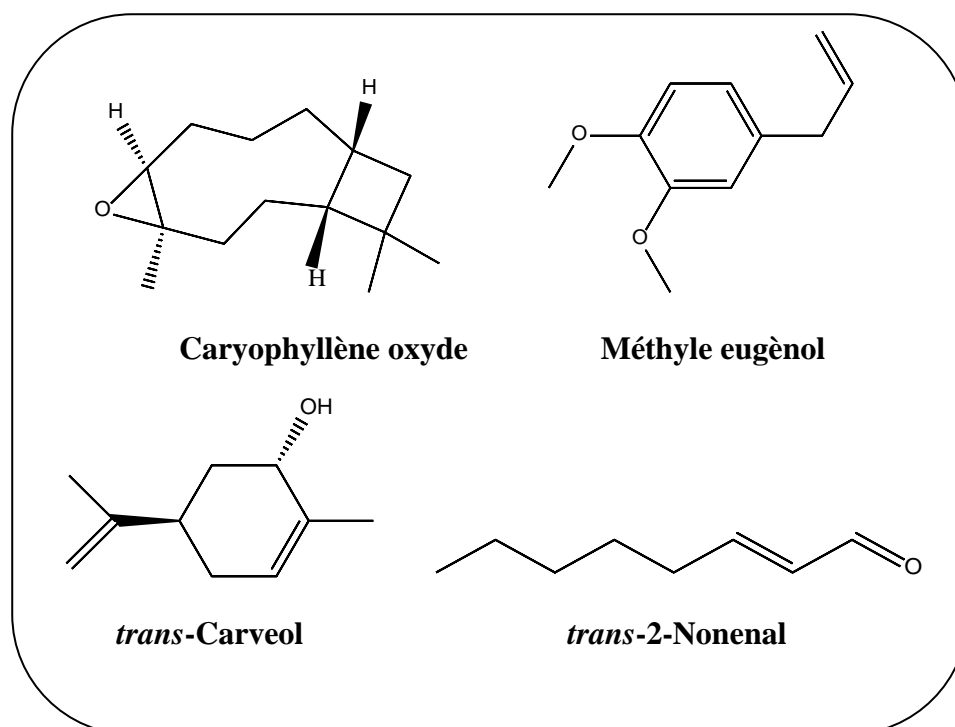
Contrairement à l'huile essentielle, il existe très peu de données dans la littérature concernant la composition chimique des hydrolats et a fortiori aucune étude concernant les hydrolats de *Ballota nigra*. Nous proposons donc dans cette partie une analyse de cet extrait obtenu par extraction à l'éther diéthylique.

7 composés ont été identifiés, ils constituent 87.6% de la composition chimique totale. Leurs indices de rétention et de leurs pourcentages relatifs sont présentés dans le **Tableau III.9**.

**Tableau III.9:** Composition chimique de l'extrait d'hydrolat de *Ballota nigra*

N°	Composés	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	HY <sup>e</sup>	Identification <sup>f</sup>
1	Octen-3-one	956	959	1292	0.5	RI, MS
2	Linalol	1086	1082	1544	<b>0.6</b>	RI, MS
3	<i>trans</i> -2-Nonenal	1135	1136	1530	<b>3.1</b>	RI, MS
4	$\alpha$ -Terpineol	1176	1180	1690	<b>2.1</b>	RI, MS
5	<i>trans</i> -Carveol	1200	1190	1825	<b>3.6</b>	RI, MS
6	Méthyle eugénol	1369	1376	2008	<b>65.2</b>	RI, MS
7	Caryophyllène oxyde	1576	1570	1980	<b>12.5</b>	RI, MS
<b>Total %</b>					<b>87.6</b>	
Monoterpènes oxygénés					71.5	
Sesquiterpènes oxygénés					12.5	
Composés non-terpéniques					3.6	

Les principaux composés chimiques qui constituent l'extrait d'hydrolat de *Ballota nigra* (**Tableau III.9**) sont le méthyle eugénol (65.2%) (**6**), le caryophyllène oxyde (12.5%) (**7**), le *trans*-carveol (3.6%) (**5**) et le *trans*-2-Nonenal (3.1%) (**3**). La structure chimique de quelques composés majoritaires de l'extrait d'hydrolat est représentée dans la **Figure III.12**.



**Figure III.12:** Composés majoritaires identifiés dans l'extrait d'hydrolat de *Ballota nigra*

#### **V. Huiles essentielles du *Cynoglossum cheirifolium***

L'étude bibliographique minutieuse menée sur les espèces de *Cynoglossum cheirifolium*, révèle que cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude sur les huiles essentielles. Ceci nous a incités à nous intéresser de près à l'étude de la composition chimique de son huile essentielle.

##### **V.1. Composition chimique de l'huile essentielle du *Cynoglossum cheirifolium***

Après l'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes du *Cynoglossum cheirifolium* par hydrodistillation, le rendement en huile essentielle a été de 0,85 %, la composition de l'huile essentielle a été analysée par CG et CPG-SM. Le mode opératoire est détaillé dans la partie, **matériels et méthodes**. Les résultats sont donnés dans le **Tableau III.10**.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes du *Cynoglossum cheirifolium* nous a permis l'identification de 32 composés, avec un pourcentage de 96,5% de la composition chimique globale. Les principaux composants sont: 11 alcanes, 6 alcools, 5 monoterpènes hydrocarbonés, 4 cétones, 3 aldéhydes, 2 acides et 1 furanne. Le composé majoritaire est le E- phytol (25.1 %) suivie par l'acide hexadécanoïque (8.5 %), 4-epi-cubebol (7.4),  $\beta$ -garganène (6.6 %) et le Z-phytol (4.2 %).

Les structures chimiques de quelques composés majoritaires de l'extrait d'hydrolat ont représentées dans la **Figure III.13**.

En comparant la composition chimique de notre huile essentielle avec les travaux antérieurs, une seule étude a été réalisés sur la partie aérienne de *cynoglossum cheirifolium* qui a montré la présence des acides gras et d'acide linoléique comme composantes majoritaires [56].

### *Chapitre III: Extraction et caractérisation des huiles essentielles*

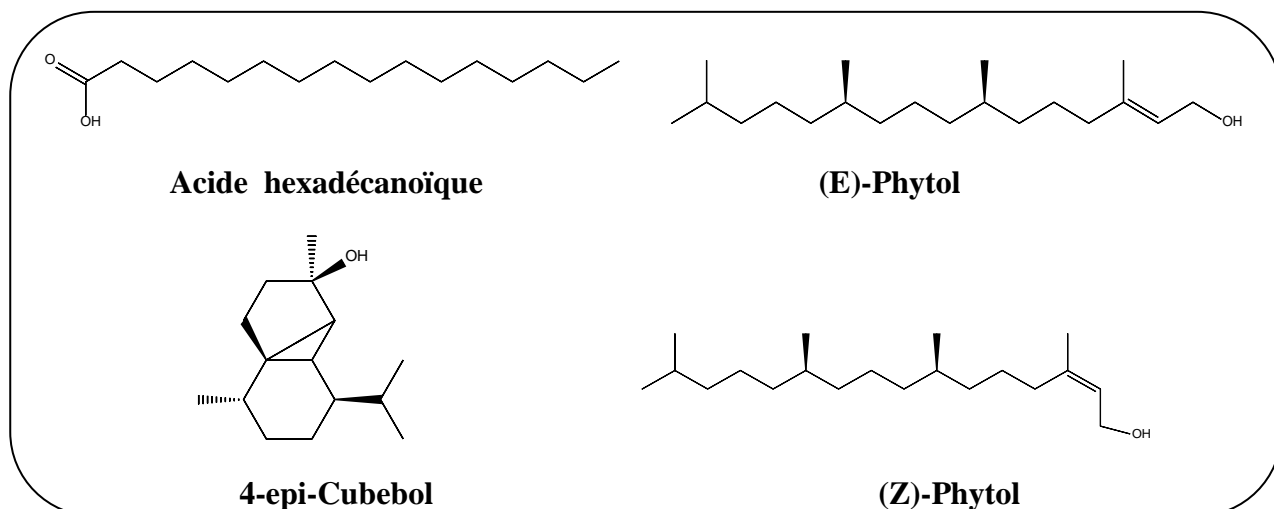
**Tableau III.10:** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes du  
*Cynoglossum cheirifolium*

Composés <sup>a</sup>	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	HE	Composés <sup>a</sup>	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	HE
Limonène	1026	1017	0.2	Undécane	1100	1100	2.8
$\alpha$ -Copaène	1379	1376	0,6	Tridécane	1300	1301	1,9
trans-Caryophyllène	1424	1428	0,9	Tétradécane	1400	1401	1.6
$\beta$ -Garganène	1440	1448	6.6	Pentadécane	1500	1500	2.2
$\alpha$ -Cadinène	1535	1528	1.0	Heptadécane	1700	1701	1,6
<b><math>\Sigma</math> Monoterpène hydrocarbonés</b>			<b>9.3</b>	Octadécane	1800	1800	1,5
4-epi-Cubebol	1487	1492	7.4	Nonadécane	1900	1900	1.1
Z-Phytol	2080	2081	4.2	Eicosane	2000	2000	2,3
E-Phytol	2107	2115	25.1	Heneicosane	2100	2101	2,5
1-Nonadécanol	2150	2143	1.1	Dicosane	2200	2199	0,8
1-Eicosanol	2292	2286	3.1	Tricosane	2300	2298	0.4
1-Heneicosanol	2365	2362	0.5	<b><math>\Sigma</math> Alcanes</b>			<b>18.7</b>
<b><math>\Sigma</math> Alcools</b>			<b>41.4</b>	Géranyl acétone	1428	1430	0.8
Décanal	1185	1185	0.6	$\beta$ -Ionone	1466	1465	1.1
Dodécanal	1389	1389	3.6	Farnesyl acétone	1871	1869	0.6
Héptadécanal	1814	1827	1,7	Héptadecane-2-one	1887	1892	1,1
<b><math>\Sigma</math> Aldehydes</b>			<b>5.9</b>	<b><math>\Sigma</math> Cétones</b>			<b>3.6</b>
Acide hexadecanoïque	1972	1970	8.5	2-Pentyl-furane	981	984	5.6
Acide octadecanoïque	2113	2110	3,5	<b><math>\Sigma</math> Furanes</b>			<b>5.6</b>
<b><math>\Sigma</math> Acides</b>			<b>12.0</b>				
<b>Taux d' identification %</b>							<b>96.5</b>

<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1);

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) reportés par König et coll., 2001.

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 (RIa).



**Figure III.13:** Composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *Cynoglossum cheirifolium*

## V.2. Composition chimique de l'extrait d'hydrolat du *Cynoglossum cheirifolium*

L'étude de la composition chimique des extraits de l'hydrolat du *Cynoglossum cheirifolium* n'a fait l'objet d'aucune étude jusqu'à présent.

Nous avons analysé par CPG et CPG-SM l'extrait de l'hydrolat du *Cynoglossum cheirifolium*. Le mode opératoire est détaillé dans la partie, **matériels et méthodes**. Les résultats sont donnés dans le **Tableau III.11**.

L'analyse de la composition chimique de l'extrait d'hydrolat du *Cynoglossum cheirifolium* nous a permis l'identification de 7 composés, avec un pourcentage de 82.3 % de la composition chimique globale. Le composé majoritaire est le linalol (25.2 %) (2) suivie de la carvone (23.2 %) (3), du (E)-2-hexène (15.3 %) (1) et du 2-undécanone (8.6 %) (5). Les structures chimiques de quelques composés majoritaires de l'extrait d'hydrolat sont représentées dans la **Figure III.14**.

**Tableau III.11:** Composition chimique de l'extrait de l'hydrolat du *Cynoglossum cheirifolium*

N°	Composés	Ria <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	HY	Identification
1	(E)-2-Hexenal	830	1213	814	15,3	RI/MS/réf
2	Linalol	1081	1540	1082	25,2	RI/MS/réf
3	Carvone	1225	1713	1212	23,2	RI/MS/réf
4	acétate de Linalyl	1236	1551	1276	3,3	RI/MS/réf
5	2-Undecanone	1273	1590	1286	8,6	RI/MS/réf
<b>Taux d'identification % (w/w)</b>					<b>82,3</b>	
% Monoterpènes oxygénés					58,4	
% Composés oxygénés non-terpéniques					23,9	

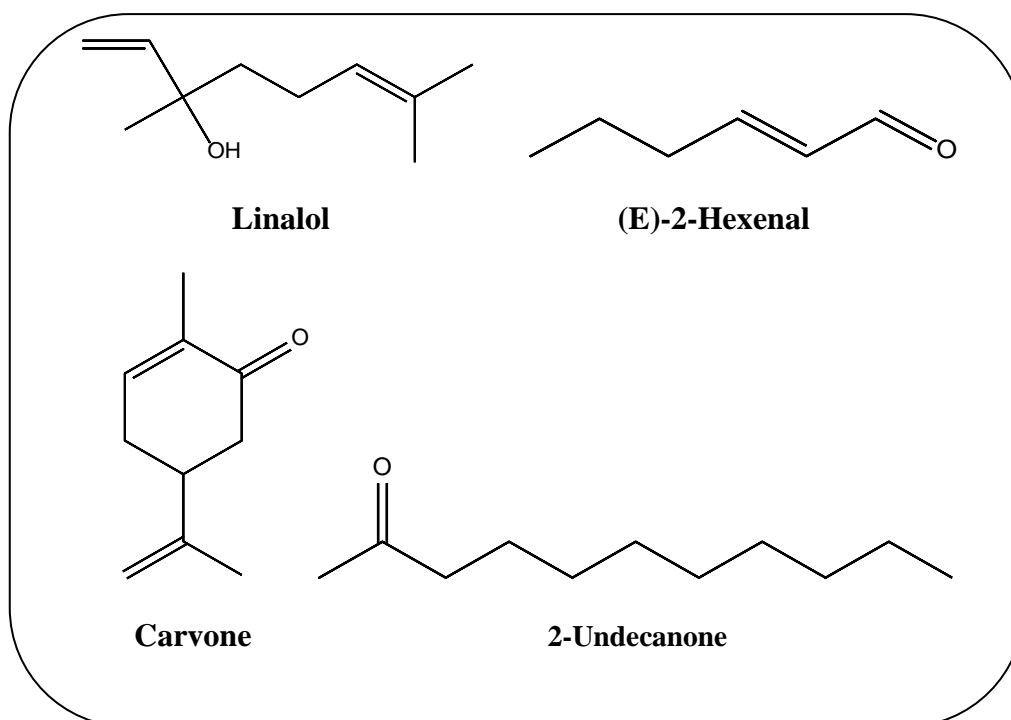
<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup> Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (RIa) reportés par Nist [5]

<sup>c</sup> Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1

(RIa).

<sup>d</sup> indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax column (RIp).



**Figure III.14:** Composés majoritaires identifiés dans l'extrait d'hydrolat de *Cynoglossum cheirifolium*

## ***Chapitre IV: Activité biologique***

*Cette partie est consacrée à la valorisation des huiles essentielles et des hydrolats des quatre plantes aromatique étudiées par l'étude de leurs activités biologiques.*

*Pour ce faire trois sous-parties essentielles, la première portera sur l'activité anti-oxydante des quatre huiles, la seconde portera sur l'activité antifongique in vitro et in vivo des huiles et des hydrolats, et enfin dans la dernière partie, l'activité insecticide de l'huile essentielle de Marrubium vulgare.*



### **I. Introduction**

Depuis l'antiquité, l'humanité a toujours envisagé l'utilisation des plantes pour leurs intérêts thérapeutiques [57-59]. L'histoire des plantes aromatiques et médicinales « PAM » est associée aux différentes étapes de civilisations. Dans le monde entier, le parcours de la recherche sur les produits naturels montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante dans la vie quotidienne: préparations culinaires, médecine traditionnelle, et parfumerie.

Cependant, en 1806, début de l'histoire de la recherche sur les produits naturels, la morphine qui est le premier principe actif d'origine végétal a été découvert, sa structure n'a été élucidée qu'en 1923 [60]. Et ce n'est qu'en 1952 que sa synthèse a été illustré [61], soit donc près de 150 ans plus tard.

Ce n'est qu'à partir du milieu du XX<sup>e</sup> siècle, dans les années 70 que le développement des techniques spectroscopiques et leurs applications, facilitent les travaux de recherches relatifs à l'isolement et la caractérisation des extraits de plantes biologiquement actifs.

Dans les années 90, les extraits des plantes font parties de 80% des médicaments. A ce titre, malgré les progrès considérable dans le domaine de la synthèse chimique, les produits naturels restent une source alternative de molécules biologiques actives du fait que 60% des anticancéreux et 70% des anti-infectieux utilisés actuellement sont d'origine naturelle[62]. Plusieurs études ont été entreprises pour identifier les molécules responsables des activités pharmacologiques des plantes d'intérêt dans le domaine thérapeutique. La recherche de nouveaux produits d'origine naturelle s'oriente alors de plus en plus vers les huiles essentielles ou bien les extraits végétaux et plus précisément aux activités biologiques de leurs constituants [63].

D'une façon générale, ces composés présentent l'intérêt d'avoir un faible impact négatif sur la santé humaine, et d'avoir un potentiel multi-usage très important. Alors que les propriétés antimicrobiennes ne sont reconnues qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, les activités antivirales, antifongique, antimitotiques, antiparasitaires, ou encore insecticides des huiles essentielles et des extraits de plantes ont fait l'objet de travaux récents [64,65].

De même, les hydrolats, sous-produits de l'hydrodistillation des végétaux sont devenus une valeur croissante du secteur des plantes aromatiques de point de vue de leur importance notamment en aromathérapie. Récemment, la valorisation des huiles essentielles est devenue un facteur de développement économique. De nombreux pays émergents, tentent de s'élargir dans ce domaine.

C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés à la valorisation des huiles essentielles et des hydrolats pour leurs activités anti-oxydantes, antifongiques et insecticides.

### II. Activités anti-oxydantes des huiles essentielles

#### II.1. Activité anti-oxydante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*

##### II.1.1. Piégeage du radical libre DPPH<sup>\*</sup>

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. Pour se renseigner sur l'activité anti-oxydante de nos échantillons, nous avons réalisé un suivi de la réaction de la réduction de DPPH par mesure de l'absorbance dans un temps définit.

Le radical libre DPPH<sup>\*</sup> a permis l'estimation de l'activité anti-oxydante. C'est un radical synthétique de couleur violette caractéristique de la solution DPPH, possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme de monomère relativement stable à température ambiante, cette couleur vire vers le jaune en présence d'antioxydant quand le DPPH est réduit.

Ce virage de couleur est accompagné d'une diminution de l'absorbance (DO) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH. Conventionnellement une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres, est considérée comme une grande activité anti-oxydante.



**Figure IV.1:** Variation de l'intensité de la couleur du DPPH en fonction de la concentration

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction de DPPH causée par différentes concentrations des huiles essentielles du *Marrubium vulgare*. D'après le tableau ci-dessous; la plus faible activité radicalaire (47.18% et 58%) a été exposée par l'huile essentielle à une concentration respectivement de 90 et 159 µg/mL, tandis que la plus forte activité (76.71% et 78.64%) a été exposée à une concentration respectivement de 792 et 951 µg/mL.

Par conséquent, l'activité anti-oxydante de l'huile essentielle augmente avec une augmentation de sa concentration. L'activité anti-oxydante de l'huile de *Marrubium vulgare* était presque 6 fois inférieure au témoin le BHT.

**Tableau IV.1:** Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'H.E du *Marrubium vulgare* et du BHT à différentes concentrations.

Echantillons	Activité anti-oxydante					
	Concentration (µg/mL)	90	159	317	792	951
Huile	Effet du balayage sur le DPPH (%)	47.18	58.00	65.62	76.71	78.64
<i>Marrubium</i>	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)					<b>99</b>
	Concentration (µg/mL)	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>25</b>
BHT	Effet du balayage sur le DPPH (%)	18.55	30.40	35.95	55.85	64.69
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)					<b>17.36</b>

### II.1.2. Test de blanchissement du β-carotène

Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique c'est à dire l'activité anti-oxydante relative (AAR) sont regroupés dans le **Tableau IV.2**.

Les résultats de l'activité anti-oxydante du *Marrubium vulgare* par la méthode de blanchissement du β-carotène sont représentés dans le **Tableau IV.2**.

Selon les résultats, la plus faible aptitude de l'huile essentielle du *Marrubium vulgare* à inhiber la formation des radicaux par l'acide linoléique est de 28.35% à une concentration de 120 µg/mL, alors que la plus forte aptitude de l'huile à inhiber la formation des radicaux par l'acide linoléique est de 95.02% avec une concentration de 600 µg/mL .

**Tableau IV.2:** Activité anti-oxydante de l' H.E. *Marrubium vulgare* et de BHT par la méthode de dosage du  $\beta$  -carotène/ acide linoléique à différentes concentrations.

Echantillons		Activité anti-oxydante relative				
		120	150	200	300	600
Huile de <i>Marrubium</i>	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène (%)	28.35	50.20	69.23	89.23	95.02
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					<b>149</b>
BHT	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>1.0</b>	<b>2.0</b>	/
	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène (%)	49.55	55.59	75.36	82.14	/
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )					<b>0.6</b>

## II.2. Activité anti-oxydante de *Ballota nigra*

### II.2.1. Piégeage du radical libre DPPH<sup>\*</sup>

Pour suivre l'activité anti-oxydante de nos échantillons en fonction du temps, nous avons fait un suivi de la réaction par mesure de l'absorbance à différents temps, c'est à dire étudié la cinétique de la réaction de réduction, les résultats sont représentés dans la **Figure II.7. Chapitre II.**

Les résultats expérimentaux montrent que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, ainsi la solution change de couleur instantanément du violet au jaune.

Pour différentes concentrations de l'antioxydant testé (BHT, l'huile essentielle des parties aériennes de *Ballota nigra*), la cinétique de réduction du DPPH<sup>\*</sup> est suivie au cours du temps jusqu'à l'obtention d'un équilibre traduit par la présence d'un palier. On constate d'après la **figure II.7** que le BHT a une diminution rapide de l'absorbance dans les premières minutes. Cette zone est observée au bout de 55 minutes pour l'huile essentielle à une concentration de 11 mg/ml.

La réaction entre le DPPH<sup>\*</sup> et le BHT donneur d'hydrogène atteint l'équilibre au bout d'un temps court par rapport à l'huile essentielle testée.

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre Teq varie en fonction des concentrations:

- Entre les 5 premières minutes: réaction rapide.

• Entre 15-55 minutes: réactions passe par un palier intermédiaire. A partir de la courbe du pourcentage de réduction % (DPPH•) en fonction de la concentration de composé, la concentration IC<sub>50</sub> et le temps T IC<sub>50</sub> est obtenue par interpolation graphique. Pour notre cas les IC<sub>50</sub> et T IC<sub>50</sub> sont déterminé expérimentalement.

Le tableau ci-dessous donne les résultats des paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction du DPPH• de nos échantillons.

**Tableau IV.3:** Les paramètres caractéristiques de la cinétique de réduction de l'huile essentielle de *Ballota nigra*

	Teq (min)	IC <sub>50</sub> (mg /ml)	T I C <sub>50</sub> (min)
HE	55	11	34
BHT	35	0.059	40

**Teq:** Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, IC<sub>50</sub>.

### II.2.2. Test de blanchissement du β-carotène

Dans le test de blanchissement du β-carotène, on utilise de l'acide linoléique, un acide gras polyinsaturé. On introduit du peroxyde d'hydrogène dans le milieu. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder la β-carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm.

Le caractère antioxydant du mélange testé engendre une neutralisation des radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, prévenant ainsi l'oxydation et donc le blanchissement du β-carotène. Ainsi, la capacité anti-oxydante de l'huile essentielle est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique[66].

**Tableau IV.4:** Activité anti-oxydante de l' H.E. *Ballota nigra* et de BHT par la méthode de dosage du  $\beta$  -carotène/ acide linoléique à différentes concentrations

Echantillons	Activité anti-oxydante relative				
	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,06	0,2	0,9	1,5
Huile de <i>Ballota</i>	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène (%)	51	53,01	68,1	82
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				<b>0.042</b>
	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>0,06</b>	<b>0,1</b>	<b>0,8</b>	<b>1,1</b>
BHT	Inhibition du blanchiment du $\beta$ -carotène (%)	50	55	78	92
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )				<b>0.021</b>
	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>0,06</b>	<b>0,1</b>	<b>0,8</b>	<b>1,1</b>

D'après les résultats du **Tableau IV.4**, on constate que le BHT et l'huile essentielle de *Ballota nigra* à différentes concentrations inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

Les résultats montrent que la plus faible aptitude de l'huile essentielle de *Ballota nigra* à inhiber la formation des radicaux par l'acide linoléique est de 51% à une concentration de 0.06  $\mu\text{g/mL}$ , ainsi que la plus grande activité inhibitrice avec une AAR estimé à 82% à une concentration de 1.5  $\mu\text{g/mL}$ , cette valeur d'activité reste significativement importante par rapport à celle du contrôle positif (BHT) qui représente 100% d'activité inhibitrice.

### **II.3. Activité anti-oxydante de *Daucus. carota ssp. sativus* par piégeage du radical libre DPPH<sup>\*</sup>**

L'activité anti-oxydante de l'huile essentielle des racines et des parties aériennes a été déterminée par le test DPPH. Le **Tableau IV.5** montre l'activité de piégeage DPPH<sup>\*</sup>, exprimée en pourcentage, causée par les différentes concentrations de l'huile essentielle du *Daucus. carota ssp sativus*.

Les résultats représentés dans le **Tableau IV.5** ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des huiles.

## Chapitre IV: Activité biologique

La plus faible activité de piégeage radicalaire (4.13%) a été exposée par l'huile essentielle de la partie aérienne à une concentration de 1.5 mg/mL, alors que la plus forte activité (80%) a été exposée par l'huile essentielle des racines à une concentration de 9 mg/mL.

L'activité DPPH est généralement présentée par la valeur de la IC<sub>50</sub> (Concentration causant 50% d'inhibition); calculée pour chaque extrait, elle permet de les classer entre eux. Plus la IC<sub>50</sub> est petite, plus la molécule est anti-oxydante. Les résultats (**Tableau IV.5**), révèlent que tous les extraits testés ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence, sont des anti-radicalaires.

**Tableau IV.5:** % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielles du *Daucus. sativus* et de l'acide ascorbique à différentes concentrations

Echantillons		Activité anti-oxydante				
HE						
<b>Racines</b>	Concentration (mg/mL)	<b>9</b>	<b>6.4</b>	<b>3.56</b>	<b>0.7</b>	<b>0.94</b>
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	80	60	40	30.27	9.930
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)					
<b>Parties aériennes</b>	Concentration (mg/mL)	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1.5</b>
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	70	27.96	10	6.61	4.13
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)					
<b>Acide ascorbique</b>	Concentration (mg/mL)	0.20	0.08	0.06	0.05	0.04
	Effet du balayage sur le DPPH (%)	98.36	97.84	68.57	51.03	39.40
	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)					

### II.4. Activité anti-oxydante du *Cynoglossum cheirifolium*

#### II.4.1. Piégeage du radical libre DPPH\*

L'activité anti-oxydante de l'huile essentielle du *Cynoglossum cheirifolium* a été évaluée par les deux méthodes, la méthode du piégeage du radical DPPH\* et celle de blanchiment du β-carotène/acide linoléique.

Dans le test de DPPH<sup>\*</sup>, l'huile essentielle du *Cynoglossum cheirifolium* était en mesure de réduire le radical DPPH<sup>\*</sup> de couleur violette en couleur jaune DPPH-H, pour atteindre 50% de réduction avec une IC<sub>50</sub> de 42.9 µg/mL (**Tableau IV.6**).

### II.4.2. Test de blanchissement du β-carotène

En outre, l'oxydation de l'acide linoléique a été également inhibée par l'huile essentielle avec une IC<sub>50</sub> de 19.3 µg/mL. En général, la comparaison de l'activité anti-oxydante l'huile essentielle du *Cynoglossum cheirifolium* avec celle exprimée par le BHT (IC<sub>50</sub> de 17.3 µg/mL pour DPPH et une IC<sub>50</sub> de 0.6 µg/mL pour l'oxydation de l'acide linoléique) a montré que l'huile essentielle possède un effet antioxydant modéré par rapport aux témoins (**Tableau IV.6**).

L'huile essentielle du *Cynoglossum cheirifolium* a montré un effet antioxydant notable. Ceci suggère que l'huile contient des composés qui sont capable de céder un atome d'hydrogéné à un radical libre afin d'éliminer un électron impair qui est responsable de la réactivité du radical, et qui inhibe l'oxydation de l'acide linoléique.

**Tableau IV.6:** IC<sub>50</sub> de l'huile essentielle mesurée par les méthodes d'inhibition de DPPH et β-carotène/ acide linoléique

Sources	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	DPPH	inhibition β-carotène/ acide linoléique
<b>HE</b>	42.9	19.3
<b>BHT</b>	17.3	0.6

### III. Activité antifongique

Les pertes post-récolte, particulièrement dues aux invasions fongiques, sont beaucoup plus importantes pour les fruits et légumes frais hautement périssables que les cultures de plein champ. Les causes des pertes post-récoltes peuvent généralement être attribuées à une dégradation pathologique due à des infections fongiques et bactériennes, à des lésions physiopathologiques pendant le stockage en raison d'un refroidissement ou d'un éclairage excessifs ou à des anomalies de la composition gazeuse atmosphérique. [67]. L'utilisation de fongicides synthétiques reste la méthode la plus courante pour contrôler la pourriture post-récolte des fruits et légumes. Toutefois, pour certaines matières premières, l'utilisation de fongicides après la récolte est interdite en raison des nombreuses restrictions normatives. De



plus, la préoccupation grandissante du public à l'égard des effets secondaires des fongicides commerciaux et de la nécessité de manger des aliments sains a contribué à la promotion de méthodes alternatives de lutte contre la carie post-récolte [68,69].

Ce présent travail repose sur l'étude de l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles extraites à partir de quatre plantes poussant à l'Ouest Algérien contre des souches fongiques appartenant aux principaux genres de moisissures causant la détérioration des denrées alimentaires particulièrement les fruits, tester aussi l'effet antifongique ces huiles essentielles, et enfin, optimiser l'étude *in vitro* par une application *in vivo* sur des fruits très sensible aux altérations d'origine fongique, les fraises et les tomates [70].

### III.1. Activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles

#### III.1.1. Activité antifongique *in vitro* de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* sur quelques souches fongique (olives et tomates)

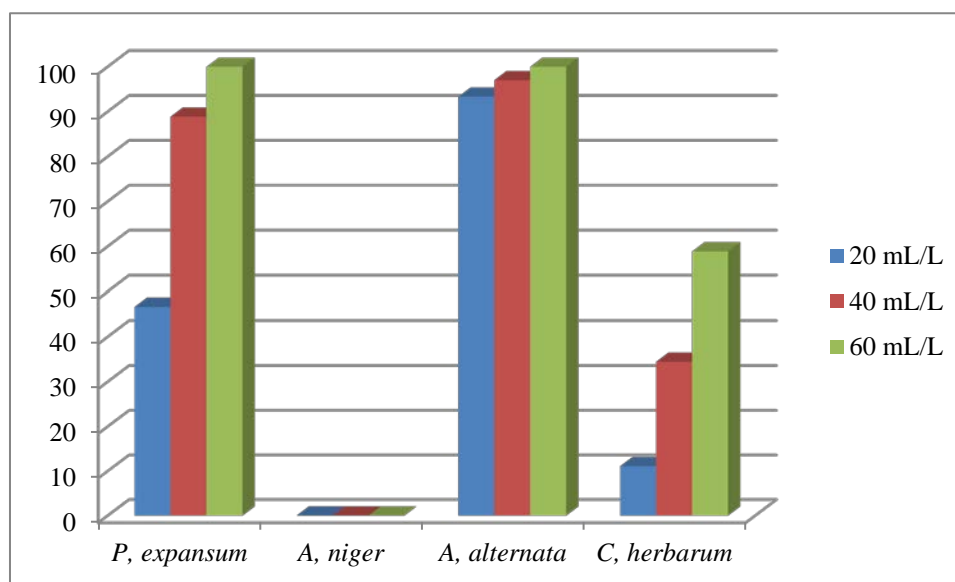
L'objectif de ce travail consiste à évaluer l'activité antifongique *in vitro* de l'huile essentielle des parties aériennes du *Marrubium vulgare* vis-à-vis de quatre champignons pathogènes: *P. expansum*, *A. alternata*, *A. niger* et *C. herbarum*, qui sont à l'origine de plusieurs maladies fongiques des olives et des tomates.

Les résultats montrent que les extraits présentaient divers inhibitions de croissance mycélienne contre les espèces de champignons et l'huile testée (**Tableau IV.7**).

Les résultats d'inhibition de la croissance mycélienne en pourcentage (%) ont montré que la croissance radiale des souches *P. expansum* et *A. alternata* a été inhibée par l'huile avec un pourcentage de 100% à une concentration de 60 mL/L. L'huile essentielle à la concentration de 40 mL/L a également montré un effet inhibiteur puissant sur la croissance radiale de l'ensemble des phytopathogènes tels que *P. expansum* (88,88%) et de *A. alternata* (97%), comme le montre le **Tableau IV.7**. L'huile essentielle est par contre sans effet contre la souche *A. niger*

**Tableau IV.7:** Effet de l'huile essentielle du *Marrubium vulgare* sur la germination des spores des microorganismes testés

microorganismes testés	Huile essentielle		
	20 mL/L	40 mL/L	60 mL/L
<i>P. expansum</i>	46.66 ± 2.46	88.88 ± 1.36	<b>100 ± 00</b>
<i>A. niger</i>	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00
<i>A. alternata</i>	93.33 ± 3.56	97 ± 2.33	<b>100 ± 00</b>
<i>C. herbarum</i>	11.11 ± 0.46	34.44 ± 0.96	58.88 ± 1.25



**Figure IV.2:** Taux d'inhibition des quatre souches en fonction de la concentration de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*

### III.1.2. Activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles extraite des quatre plantes sur les souches infectant les tomates

Les données présentées dans le **Tableau IV.8** montrent l'activité antifongique des huiles essentielles de *Marrubium vulgare*, *Daucus. carota ssp. sativus*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum chéirifolium* contre *P. expansum*, *A. niger* et *A. alternata*. L'effet de l'huile essentielle varie en fonction des concentrations.

- ❖ L'huile essentielle de *Marrubium vulgare* a montré une activité inhibitrice contre 2 des 3 champignons testés. Elle a inhibé complètement la croissance de *P. expansum* et *A. alternata* (100%) à la concentration de 30 mL/L. D'autre part, l'huile essentielle n'a aucun effet contre *A. niger* (**Tableau IV.8**).
  
- ❖ L'huile essentielle des racines de *Daucus. carota ssp. sativus* exerce une activité antifongique significative seulement à 10 mL/L d'huile, et inhibé *A. alternata* avec un pourcentage de 95.6%. Par contre pour *P. expansum* un pourcentage maximal de 31.11% est atteint à 30 mL/L (**Tableau IV.8**).
  
- ❖ L'huile essentielle de *Ballota nigra* provoque la réduction des mycéliums de *P. expansum* et *A. alternata* alors qu'elle est sans effet sur *A. niger*. Cette activité antifongique est plus prononcée pour *A. alternata*, avec un pourcentage d'inhibition de 98,2% à 10 mL/L, atteignant un maximum de 100% à 20 mL/L. Pour *P. expansum*, le pourcentage d'inhibition est de 58,4% à 10 mL/L, pour atteindre un maximum de 88,88% à 30 mL/L (**Tableau IV.8**).
  
- ❖ L'huile essentielle de *Cynoglossum chéirifolium* a complètement inhibé la croissance de *A. alternata* (100%) à une concentration de 30 mL/L. De même *P. expansum* montre une sensibilité à une concentration de 30 mL/L et avec un pourcentage d'inhibition de 74,28%, (**Tableau IV.8**).

**Tableau IV.8:** Activité antifongique des huiles essentielles contre les souches phytopathogènes

microorganismes testés	Pourcentages d'inhibition		
	10	20	30
<b>HE <i>M. vulgare</i> (mL/L)</b>			
<i>A. niger</i>	00± 00 <sup>a</sup>	08.5± 0.9 <sup>a</sup>	16.2 ± 1.2 <sup>a</sup>
<i>P. expansum</i>	46.7 ± 2.4 <sup>b</sup>	88.9± 1.4 <sup>bc</sup>	94.4 ± 3.2 <sup>c</sup>
<i>A. alternata</i>	93.3± 3.5 <sup>c</sup>	95.5± 2.3 <sup>c</sup>	<b>100 ± 00<sup>c</sup></b>
<b>HE <i>D. sativus</i> (mL/L)</b>			
<i>A. niger</i>	00± 00 <sup>a</sup>	06.3± 0.5 <sup>a</sup>	18.1± 3.2 <sup>a</sup>
<i>P. expansum</i>	09,8± 0.13 <sup>b</sup>	20,11±0,11	31.11± 3.11
<i>A. alternata</i>	95.3± 3.5 <sup>c</sup>	<b>100 ± 00<sup>c</sup></b>	<b>100 ± 00<sup>c</sup></b>
<b>HE <i>B. nigra</i> (mL/L)</b>			
<i>A. niger</i>	00± 00 <sup>a</sup>	00± 00 <sup>a</sup>	12.4± 2.3 <sup>a</sup>
<i>P. expansum</i>	58,41± 1.36 <sup>b</sup>	84,44±0,08 <sup>bc</sup>	88,88± 2.36 <sup>c</sup>
<i>A. alternata</i>	98.2± 2.5 <sup>c</sup>	<b>100 ± 00<sup>c</sup></b>	<b>100 ± 00<sup>c</sup></b>
<b>HE <i>C. cheirifolium</i> (mL/L)</b>			
<i>A. niger</i>	00± 00 <sup>a</sup>	00± 00 <sup>a</sup>	00± 00 <sup>a</sup>
<i>P. expansum</i>	44.6 ± 1.4 <sup>b</sup>	66,66± 0.08	74,28± 3.3 <sup>c</sup>
<i>A. alternata</i>	95.3± 3.5 <sup>c</sup>	99.2± 1.5	<b>100 ± 00<sup>c</sup></b>

Dans la colonne, les valeurs moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon l'analyse statistique ( $P \leq 0,05$ ).

### III.2. Effet des huiles essentielles et des hydrolats sur l'inhibition de décroissance fongique *in vivo* de la tomate

En raison des résultats prometteurs des tests *in vitro*, les huiles essentielles et les hydrolats extraits des quatre plantes étudiées: *Marrubium vulgare*, *Daucus. carota ssp. sativus*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum. cheirifolium* ont été choisie pour déterminer les effets protecteurs sur les fruits de tomates contre l'infection causée par *A. alternata*.

La **Figure IV.3.** montre l'efficacité *in vivo* des huiles essentielles et des hydrolats, sur le contrôle de la croissance fongique, provoquée par *A. alternata*, stockée à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 15 à 20 jours.

Des observations ont montré que le traitement des tomates par les différentes huiles essentielles a entraîné une réduction remarquable de la gravité de la maladie par rapport aux

témoins. Les huiles essentielles des quatre plantes étudiées, utilisées avec la concentration de 0,5 mL/L d'air ont montrés une activité protectrice très intéressante contre la pourriture noire des tomates jusqu'à 20 jours, par rapport au témoin (**Tableau IV.9**).

De même les résultats des tests *in vivo* sur la souche de *A. alternata*, responsable de la pourriture noire des tomates par l'hydrolat des quatre plantes sont présentés dans les photos de la **Figure IV.3**. Selon les résultats, ces hydrolats ont montré une forte activité antifongique. Même à la fin du 20<sup>ème</sup> jour, nous avons remarqué qu'il n'y avait pas des lésions chez les tomates traitées par rapport au témoin négatif.

Les résultats des tests ne montrent aucune incidence de la maladie (Voir photos (A), (A') et (B), (B')) après 20 jours de stockage à une température de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  pour les tomates non inoculées traitées par les huiles et par les hydrolats, et inoculées, alors que pour les tomates non traitées, nous avons remarqué une forte incidence de la maladie (photos (C)).

**Tableau IV.9:** Effet protecteur des huiles essentielles extraite des quatre plantes sur l'infection causée par *A. alternata* des tomates

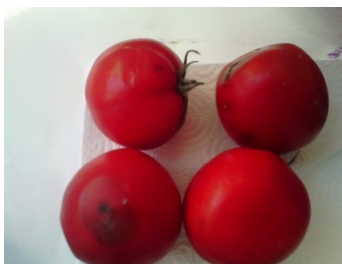
Jours <sup>a</sup>	Pourcentage de détérioration PDI <sup>c</sup> (%)					
	Contrôle négatif <sup>b</sup>	Contrôle positif <sup>b</sup>	HE <i>Marrubium</i>	HE <i>D. sativus</i>	HE <i>B. nigra</i>	HE <i>Cynoglossum</i>
1 <sup>er</sup> jour	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2 <sup>ème</sup> jour	0 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
4 <sup>ème</sup> jour	20 <sup>b</sup>	40 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
8 <sup>ème</sup> jour	40 <sup>c</sup>	60 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
10 <sup>ème</sup> jour	80 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
12 <sup>ème</sup> jour	100 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	0 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
15 <sup>ème</sup> jour	100 <sup>d</sup>	100 <sup>d</sup>	10 <sup>ab</sup>	10	5	0

<sup>a</sup> Jours de stockages; <sup>b</sup> Contrôle négatif, les fruits de tomate ont été lavées seulement avec l'eau distillé et Contrôle positif, Le fruit de tomate n'a été inoculé qu'avec *A. alternata*; <sup>c</sup> Pourcentage de détérioration (PDI). Les moyennes dans une colonne suivies de la (des) même (s) lettre (s) représentent des valeurs qui ne sont pas significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ).

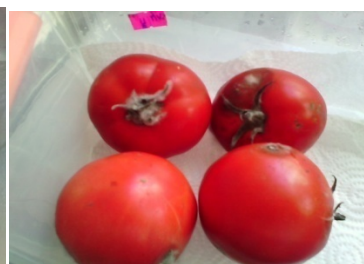
- *M. vulgare*



(C)



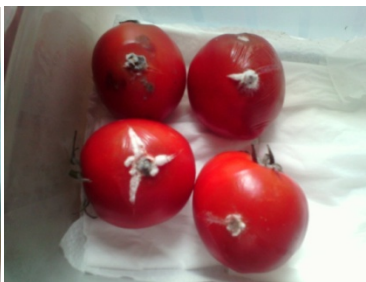
(A)



(B)



(C)



(A')



(B')

▪ *Daucus. carota ssp. sativus*



(C)

(A)

(B)



(C)

(A')

(B')

▪ *Ballota nigra*



(C)

(A)

(B)

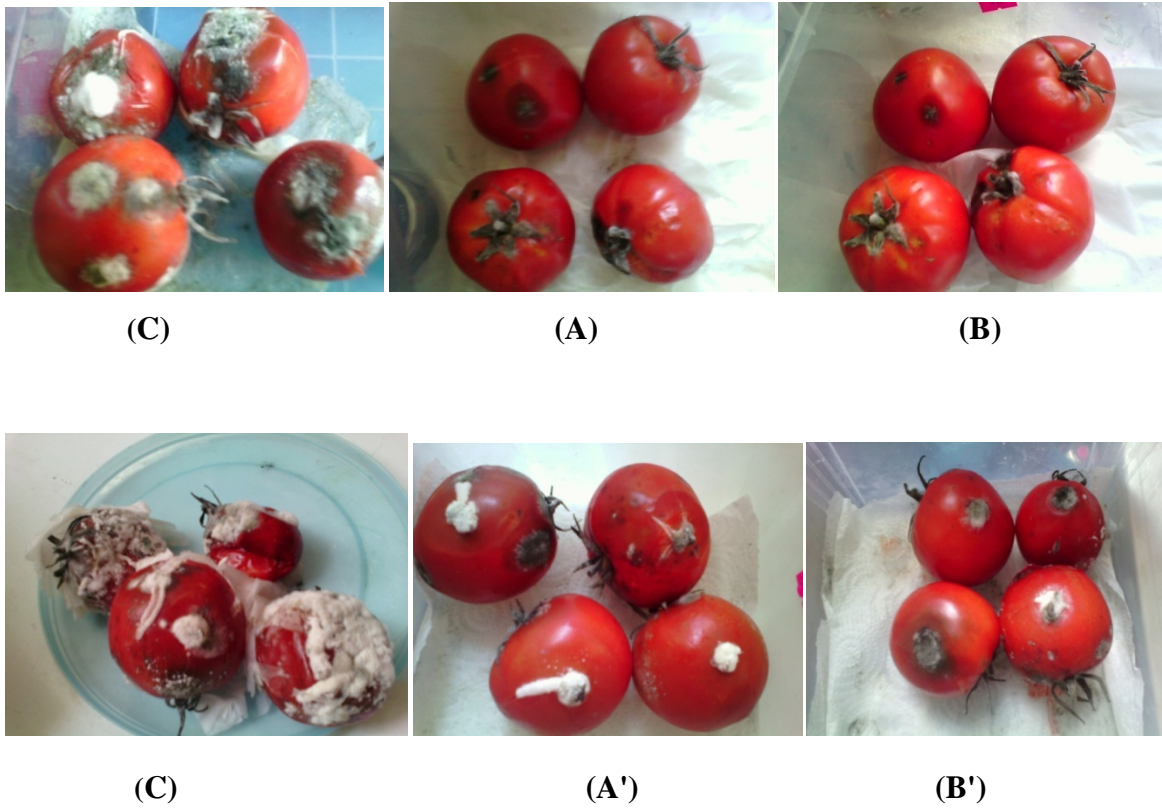


(C)

(A')

(B')

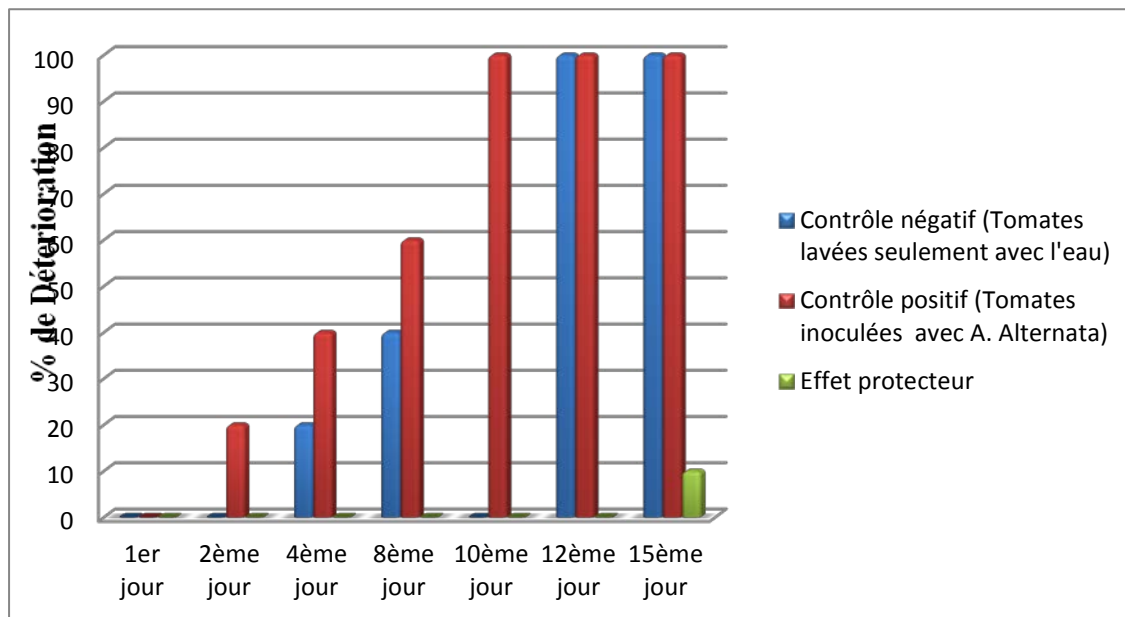
▪ *Cynoglossum cheirifolium*



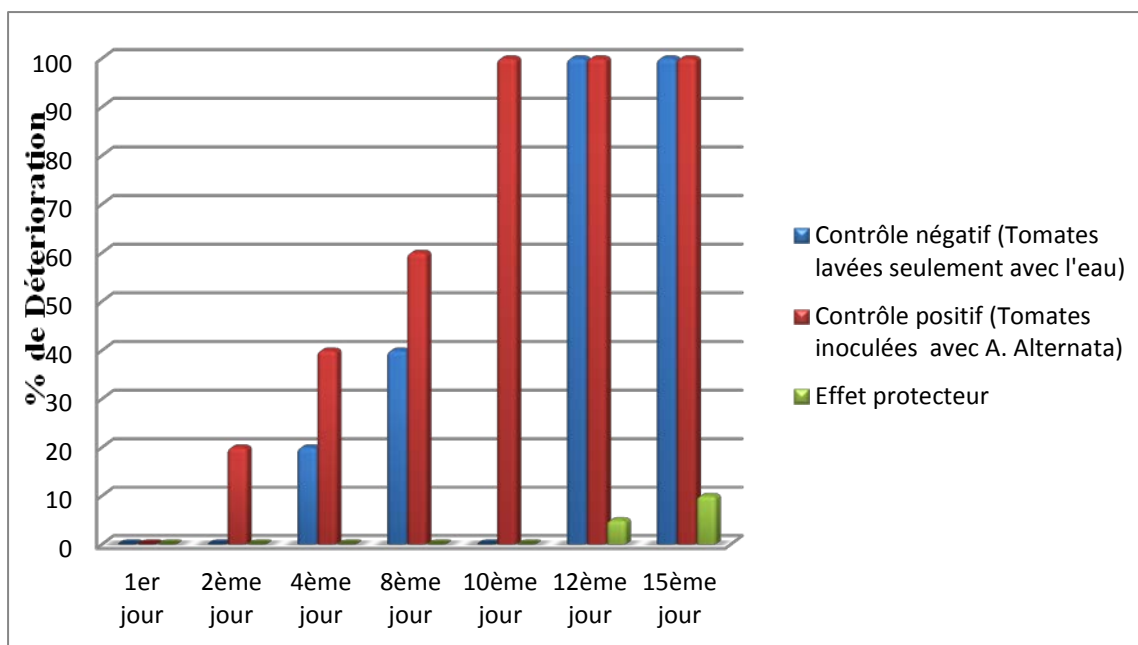
**Figure IV.3:** Effet protecteur des huiles essentielles (A) et des hydrolats (B) et effet préventif des huiles essentielles (A') et des hydrolats (B') après 15 et 20 jours de stockage respectivement à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , contrôles (C).



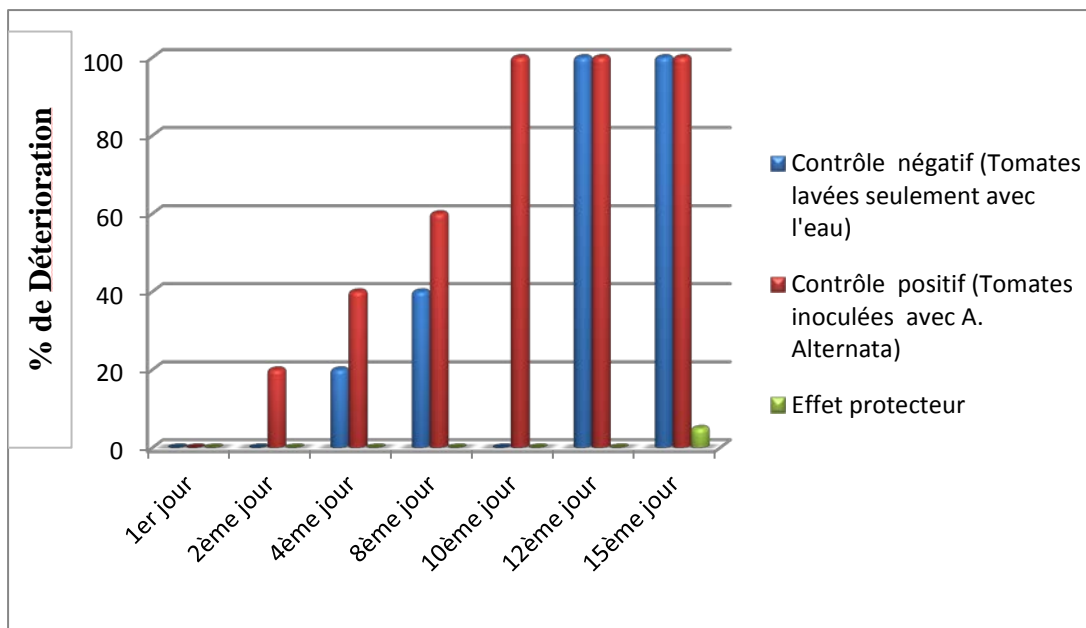
▪ *Marrubium vulgare*



▪ *Daucus carota ssp sativus*



▪ *Ballota. nigra*



▪ *Cynoglossum cheirifolium*

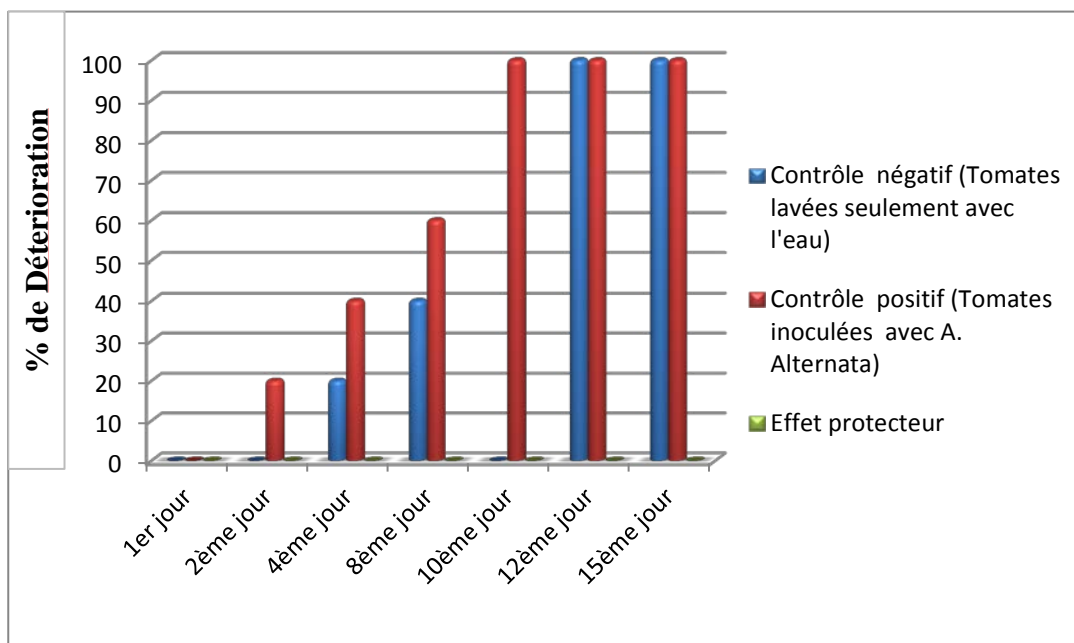


Figure IV.4: Contrôle négatif (a), Contrôle positif (b) et effet protecteur (c) des huiles essentielles contre les infections causée par *A. Alternata*.

### III.3. Activité antifongique du *Daucus. carota ssp. sativus* sur le fruit des fraisières

La fraise est un fruit particulièrement périssable pendant le stockage post-récolte. Les produits naturels sont des substances qui sont connues pour ne pas nuire à l'environnement et à la santé humaine et qui sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Les huiles essentielles de plantes et leurs terpénoïdes ont de nombreuses applications en médecine populaire, en préservation des aliments ainsi que dans les industries pharmaceutiques [71,72]. De nombreuses études ont été menées pour montrer les activités antifongiques *in vivo* des huiles essentielles contre les champignons pathogènes responsables de la détérioration des aliments [73-77]. Cependant, très peu d'études sur les effets antifongiques des huiles essentielles végétales pour contrôler les champignons des fruits de la fraise *in vivo* [78-80] ont été réalisées. Des études ont montré que l'huile de thym, l'huile de cumin et les traitements combinés avec l'ensemble *Lactobacillus plantarum* et l'huile de cumin et l'ensemble *Lactobacillus plantarum* et l'huile de thym ont permis un contrôle important des infections à *Botrytis* de fruits de fraise. Selon S. Mohammadi *et al* [81], l'application de l'huiles de fenouil, d'anis, de menthe poivrée et de cannelle a montré que toutes ces huiles essentielles provoquaient une augmentation de la durée de conservation des fruits et inhibaient la croissance de *B. cinerea* par rapport aux témoins. Les hydrolats sont des composés précieux pour l'industrie cosmétique et pour l'agriculture biologique, comme contre les champignons et sont utilisés pour la fertilisation des sols [82]. À notre connaissance, il n'y a aucun rapport sur les activités antifongiques *in vitro* et *in vivo* des extraits d'hydrolats et des huiles essentielles de *Daucus. carota ssp. sativus*. Ce travail est une partie de notre programme continu visant à isoler des composés et des extraits qui pourraient contrôler les maladies fongiques. Le but principal de ce travail réside à l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle ainsi que l'extrait d'hydrolat de *Daucus. carota ssp. sativus* vis-à-vis de trois agents phytopathogènes qui sont: *P. expansum*, *A. niger* et *B. cinerea* responsable de la pourriture de fruit de fraises, et évaluer par la suite l'activité antifongique *in vivo* contre le champignon pathogène *B. cinerea*.

#### III.3.1. Activité *in vitro* sur les souches fongiques responsables de la pourriture des fraises

Les effets inhibiteurs de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat des racines et des parties aériennes du *Daucus. carota ssp. sativus* ont été évalués contre trois champignons pathogènes: *P. expansum*, *A. niger* et *B. cinerea* responsable de la pourriture de fruit de fraises. Les résultats montrent que les extraits présentaient divers inhibitions de croissance

mycélienne contre les espèces de champignons testés (**Tableau IV.10**).

Les résultats de l'inhibition de la croissance mycélienne en pourcentage (%) ont indiqué que la croissance radiale des souches *P. expansum* et *B. cinerea* a été inhibée par l'huile essentielle des racines du *Daucus. carota ssp. sativus* avec un pourcentage de 100% à une concentration de 70 mL/L. Cependant, l'extrait d'hydrolat de racines à la concentration de 0,1 mL/L a montré un effet inhibiteur puissant sur la croissance radiale de l'ensemble des phytopathogènes testés *P. expansum* (88,88%) et de *B. cinerea* (86,55%), comme le montre le **Tableau IV.10**.

L'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat des parties aériennes sont par contre, sans effet contre *P. expansum*, *A. niger* et *B. cinerea*.

**Tableau IV.10:** Effet de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat sur la germination des spores des microorganismes testés

Microorganismes testés	Hydrolats		Huiles essentielles			
	Racines	Parties aériennes	Racines	Parties aériennes	Racines	Parties aériennes
	0.1 mg/L	0.14 mg/L	30 mL/L	100 mL/L	70 mL/L	400 mL/L
<i>P. expansum</i>	88.88± 2.56	00± 00	31.11± 3.11	00± 00	<b>100 ± 00</b>	00± 00
<i>A. niger</i>	33.33± 3.22	00± 00	6.66 ± 1.02	00± 00	21.11± 1.89	00± 00
<i>B. cinerea</i>	86.55± 1.56	00 ± 00	<b>66.35 ± 4.22</b>	00 ± 00	<b>100 ± 00</b>	00 ± 00

### III.3.2. Effet de l'huile essentielle et de l'hydrolat des racines du *Daucus. carota ssp. sativus* sur l'inhibition de décroissance fongique *in vivo* sur la fraise

En raison des résultats prometteurs des tests *in vitro*, l'huile essentielle et l'hydrolat des racines de *Daucus. carota ssp. sativus* ont été choisis pour déterminer les effets de prévention et de protection contre l'infection causée par *B. cinerea* dans les fraises.

La **Figure IV.6** montre l'efficacité *in vivo* de l'huile essentielle et de l'hydrolat concernant le contrôle de la croissance fongique, causée par de *B. cinerea*, sur les fraises stocké à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 7 jours. Les résultats ont montré que le traitement de la fraise avec l'huile essentielle et l'hydrolat a entraîné une diminution notable de l'incidence de la maladie par rapport à celle des témoins. Lorsque nous comparons les activités de prévention et de protection de l'huile

essentielle et de l'hydrolat de l'infection causée par *B. cinerea*, nous observons que les deux extraits ont le plus d'effet sur la gravité de la maladie de l'agent pathogène (Figure IV.6).

L'huile essentielle et l'hydrolat avec la concentration de 0,01 mL/L et 0,1 mL/L, ont une activité très intéressante qui protège la fraise jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de la pourriture grise de *B. cinerea* respectivement, par rapport à celui du contrôle, qui a commencé à pourrir, au cours du 3<sup>ème</sup> jour (Figure IV.5, a). Dans le traitement de protection, les résultats ont montré que 100% du contrôle positif des fraises développent la moisissure grise au bout de 2 jours. La gravité de la maladie causée par *B. cinerea* était considérablement réduite par l'huile essentielle et l'hydrolat, après 7 jours de traitement (Figure IV.5, b).

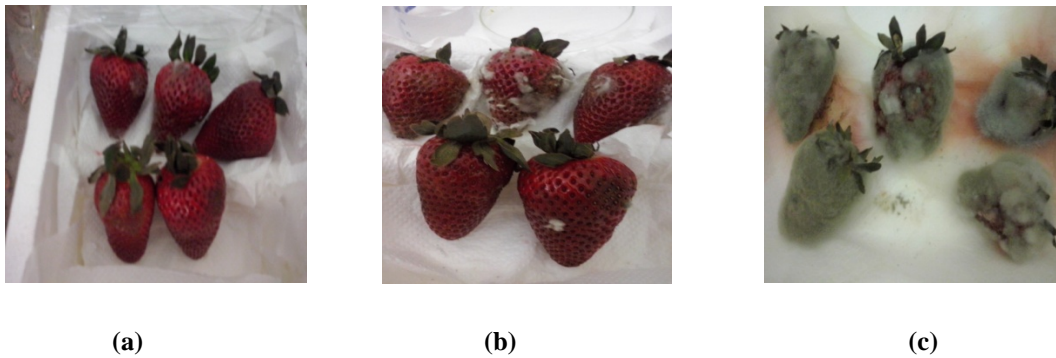


Figure IV.5: Effet de prévention et de protection de l'huile essentielle (a) et de l'hydrolat (b) durant sept jours de stockage à 24± 1°C, contrôles (c).

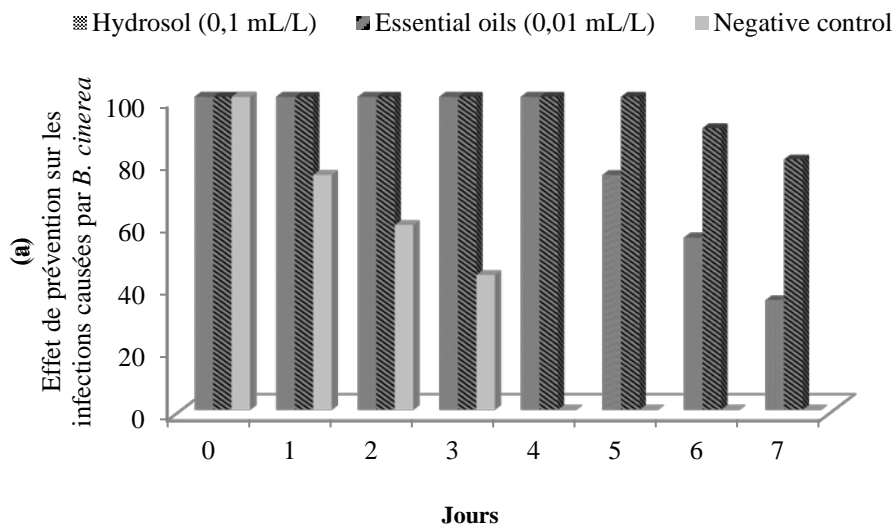


Figure IV.6: Effet de prévention (a) et effet de protection (b) de l'huile essentielle et de l'hydrolat des racines sur les infections causées par *B. cinerea*

### III.3.3. Evaluation de la consommation des fraises stockées (Test de gout)

Le **Tableau IV.11** montre les scores d'acceptabilité des échantillons de fraise. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans les propriétés sensorielles entre les échantillons traités avec l'hydrolat et du contrôle (sans hydrolat). Les échantillons traités avec de l'huile essentielle, avaient un goût légèrement plus élevé et leurs scores globaux d'acceptation ont été jugés acceptables par les panélistes au niveau de supplémentation.

**Tableau IV.11:** Effet de l'huile essentielle et de l'hydrolat sur les scores sensoriels d'acceptabilité des fruits de fraises stockés à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Traitement	Acceptabilité	Contrôle
Hydrolat (0.1 mg/mL)	4.0	
Huile essentielle (0.01 mL/mL)	3.8	4.5

Les résultats sont exprimés comme la moyenne de toutes les qualités, 1= Extrêmement inapprécié, 2= Inapprécié, 3= indifférent, 4 = apprécié; 5 = extrêmement apprécié.

### IV. Activité insecticide de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*

Les insectes ont développé une résistance contre les insecticides, en raison de l'utilisation extensive et indiscriminée de ces divers groupes chimiques qui sont les outils de base pour la gestion des populations de moustiques.

L'importance des plantes médicinales et aromatiques, y compris les espèces qui accumulent des produits volatiles, est augmentée de façon continue. L'utilisation des produits naturels renfermant les huiles essentielles pour la protection des cultures a été employée régulièrement comme bio-pesticides en phyto-protection [83].

Les pesticides de synthèse sont aujourd'hui d'un usage fréquent tant en agriculture. Donc, le recours à des molécules naturelles insecticides se révèle être une démarche alternative.

Actuellement, les insecticides à base d'huiles essentielles font l'objet d'études pour prendre la place des insecticides chimiques dans le domaine de la phyto-protection.

À notre connaissance, il n'existe pas de travaux sur l'évaluation de l'activité larvicide de l'huile essentielle du *Marrubium vulgare* contre le parasite *Tuta. absoluta* insecte ravageur des tomates.

les résultats de la fumigation de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* contre *Tuta. absoluta* sont résumés dans **Tableau IV.12**. L'huile essentielle de *Marrubium vulgare* à la

plus basse concentration (3,5 µl/L d'air) a causé un pourcentage de mortalité de 20, 26 et 46% pour les 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stades larvaires respectivement et plus de 57% pour les adultes après une journée d'exposition.

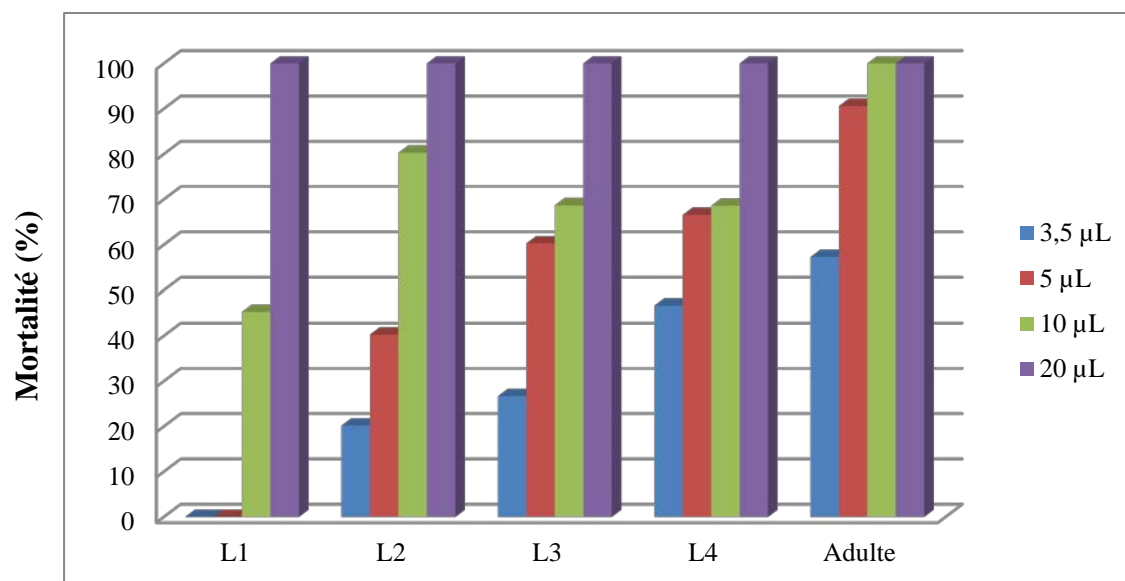
Cependant, les résultats indiquent que le pourcentage de mortalité augmente avec la concentration d'huile essentielle. À la concentration la plus élevée (20 µl/L d'air), l'huile essentielle a causé 100% de mortalité pour tous les stades larvaires et pour les adultes après une journée d'exposition (**Tableau IV.12**). Les valeurs de la LC<sub>50</sub> du 1<sup>er</sup> au 4<sup>ème</sup> stade étaient respectivement de 12.4, 6.6, 4.4 et 3.9 µl/L d'air. Les valeurs de la LC<sub>90</sub> étaient respectivement de 9.9, 16.3, 14.2 et 14.3 µl/L d'air. De plus, le **Tableau IV.12** montre que les adultes sont beaucoup plus sensibles à l'huile essentielle que les larves ayant des concentrations létales, LC<sub>50</sub> et LC<sub>90</sub> respectivement de 3.4 et 9.4 µl /L d'air (**Tableau IV.12**).

**Tableau IV.12:** Activité larvicide de l'huile essentielle du *Marrubium vulgare* contre *Tuta absoluta*

Concentrations (µL/L air)	% Mortalité ± SE				
	1 <sup>er</sup> stade	2 <sup>ème</sup> stade	3 <sup>ème</sup> stade	4 <sup>ème</sup> stade	Adultes
3.5	00 ± 00 <sup>a</sup>	20.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	26.7 ± 1.6 <sup>a</sup>	46.7 ± 3.6 <sup>a</sup>	57.3 ± 2.2
5	00 ± 00 <sup>a</sup>	40.3 ± 2.6 <sup>b</sup>	60.3 ± 3.6 <sup>b</sup>	66.6 ± 3.6 <sup>b</sup>	90.6 ± 3.2
10	45.3 ± 3.6 <sup>b</sup>	80.3 ± 2.3 <sup>b c</sup>	68.7 ± 2.1 <sup>b</sup>	68.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	100 ± 0.0 <sup>c</sup>
20	100 ± 0.0 <sup>c</sup>	100 ± 0.0 <sup>c</sup>	100 ± 0.00 <sup>c</sup>	100 ± 0.0 <sup>c</sup>	100 ± 0.0 <sup>c</sup>
<b>LC<sub>50</sub>(µL/L air)</b>	12.4	6.6	4.4	3.9	3.4
<b>LC<sub>90</sub> (µL/L air)</b>	19.9	16.3	14.2	14.3	9.4

Dans la colonne, les valeurs moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon l'analyse statistique (P ≤ 0,05)

La **figure IV.7** illustre les pourcentages de mortalité des populations larvaires des stades L1, L2, L3, L4 et adulte après l'application de l'huile essentielles de *Marrubium vulgare* à différentes doses.



**Figure IV.7:** Effet de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* sur les différents stades larvaires de *Tuta absoluta*

## V. Discussions

### 1. Activité anti-oxydante

Nous avons testé l'activité anti-oxydante par deux méthodes différentes puisque, les résultats d'une seule méthode ne peuvent donner qu'une suggestion réduite de l'activité anti-oxydante. En plus, la complexité chimique des huiles essentielles, qui sont souvent un mélange de plusieurs composés avec des groupes fonctionnels différents; et la polarité et le comportement de produits chimiques peuvent mener à une différence de résultats, selon la méthode utilisée. L'activité anti-radicalaire des huiles essentielles extraite des quatre plantes étudiées a été évaluée suivant la méthode de DPPH•. Cette méthode peut être employée pour évaluer l'activité anti-radicalaire dans une courte durée. Presque 90% des études sur l'activité anti-oxydante utilisent la méthode du DPPH• [84]. Cette méthode est simple mais fortement sensible [85]. Dans ce test, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage d'un radical libre DPPH• par les fractions anti-oxydantes (huile essentielle) [86].

Dans la présente étude, On remarque que presque tous les extraits étudiés possèdent une activité anti-oxydante et ils sont capables de piéger le radical DPPH•. L'huile essentielle des racines du *Daucus. carota ssp. sativus* a montré une forte activité anti-oxydante avec une IC<sub>50</sub> de 4.94 par rapport à l'huile essentielle des parties aériennes avec une IC<sub>50</sub> de 10.14 en se référant à celle de l'acide ascorbique, alors qu'en comparant les IC<sub>50</sub> des trois autres huiles essentielles avec celle de BHT pris comme référence, nous avons remarqué que l'huile



essentielle de *Ballota nigra* a présenté l'activité anti radicalaire la plus élevée avec une IC<sub>50</sub> de 11, suivi de l'huile de *Cynoglossum cheirifolium* avec une IC<sub>50</sub> de 42.9 et enfin celle du *Marrubium vulgare* avec une IC<sub>50</sub> de 99.

L'effet anti-radicalaire des huiles essentielles sur le DPPH• est dû à leur capacité donatrice d'un atome d'hydrogène [87].

D'après Kulisic et al [88], la méthode de DPPH• ne dépend pas de la polarité du substrat. De même, d'autres auteurs ont rapporté que la polarité du substrat n'affecte pas l'activité de balayage du DPPH• [89,90]. La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes de la capacité à piéger les radicaux libres.

L'effet anti-radicalaire de l'huile essentielle des racines du *Daucus. carota ssp. sativus* pourrait être dû à la présence des composés oxygénés [91].

D'autre part, la peroxydation des lipides a été étudiée dans l'oxydation des aliments. Un des mécanismes les plus connus est celui des acides gras insaturés, notamment l'acide linoléique [85]. Dans ce contexte, nous avons testé l'activité anti-oxydante des huiles essentielles étudiées par la méthode de blanchiment du β-carotène.

D'après les résultats du test de blanchiment du β-carotène en présence de l'huile essentielle de *Ballota nigra* et de BHT, l'huile essentielle semble inhiber d'une manière très efficace, l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène par rapport au BHT avec une IC<sub>50</sub> de 0.042. Cette activité anti-oxydante est suivi par celle de l'huile de *Cynoglossum cheirifolium*, par contre l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* inhibe moyennement cette oxydation. Ces résultats sont probablement dus à la haute spécificité de l'essai du blanchissement du β-carotène pour les composés lipophiles [92].

### 2. Activité antifongique

De nombreuses maladies fongiques attaquent les cultures vivrières dans le monde entier; la plupart d'entre eux sont liés à des maladies fongiques pathogènes.

Les moisissures sont des agents biologiques présents souvent, qui sont capables d'infecter des aliments en raison de leur capacité de synthétiser une grande diversité d'enzymes hydrolytiques. Ils provoquent des troubles pathologiques chez les plantes, causant par la suite des pertes économiques considérables pour les producteurs de denrées alimentaires.

En effet, l'étude de l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo* nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique des quatre huiles essentielles ainsi que leurs hydrolats vis-à-vis des souches fongiques responsable de la pourriture noire des tomates, et de la pourriture grise des fraises.

Nous constatons que les souches *P. expansum* et *A. alternata* responsable des maladies fongique des tomates sont très sensible vis-à-vis des différentes huiles étudiées. De même les souches *B. cinerea* et *P. expansum* responsable des maladies fongiques de fraises qui ont été inhibé complètement par l'huile de *Daucus. carota ssp. sativus*.

De plus, les quatre huiles essentielle et hydrolats réduisent significativement la pourriture dans la tomate inoculée par *A. alternata* (**Figure IV.5**). La croissance du micro champignon a été inhibée principalement de 90% jusqu'à 15 jours de stockage pour les huiles et 20 jours pour les hydrolats. On sait que les souches fongiques sont à l'origine de différentes maladies du sol, qui surviennent le plus souvent à des températures douces et froides, qui affectent principalement les feuilles et les tiges. *Alternaria spp.* et sont plus fréquents dans les zones d'humidité relative élevée, et peuvent affecter directement les fruits [93]. Notamment, les résultats ont montré que le traitement par l'huile essentielle et l'hydrolat de *Daucus. carota ssp. sativus* présentaient une activité protectrice très intéressante contre la pourriture grise des fraises causée par *B. cinerea*, jusqu'à 7 jours de stockage par rapport au témoin. **Figure IV.6**.

D'autre part, les terpénoïdes sont connu comme des composants majeurs des huiles essentielles végétales. Ces derniers constituent principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes et sont supposés être responsables de nombreuses activités biologiques telles que les activités antifongiques, antimicrobiennes et herbicides [94,95]. Certaines huiles essentielles ont été jugées très efficaces contre les agents pathogènes résistants aux fongicides [74], [96]. Par exemple, l'application de vapeur d'huile essentielle de *Cicutavi rosa* a donné les pourcentages les plus faibles d'infection dans les tomates cerises inoculées par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* et *Alternaria alternata* comparativement au témoin non traité. Des effets similaires de l'huile essentielle de graines d'*Anethum graveolens* ont été rapportés sur les mêmes champignons par le même auteur [97] qui indiquent que les traitements fumigeant et de contact en supprimant *Alternaria alternata* de tomates cerise.

De ce fait, les propriétés antifongiques de nos extraits (huiles et hydrolats) peuvent être liées donc à la présence de fortes concentrations de sesquiterpènes hydrocarbonées, tels que le E- $\beta$ -farnésène, le E- $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène et le  $\beta$ -bisabolène dans l'huile de *Marrubium* par exemple.

Les sesquiterpènes possèdent un large spectre d'activité biologique à travers lequel ils semblent jouer un rôle très important dans les mécanismes de défense des plantes [98]. Par exemple, le  $\beta$ -caryophyllène, un composé qui se trouve dans les mélanges d'épices, les arômes d'agrumes, des savons, des détergents, des crèmes et des lotions, ainsi que dans une variété de produits alimentaires et de boissons [99,100], est connu pour ces activités biologiques, tels

que l'activité insecticide [101,102], antimicrobien [103], anesthésique local [104], anti-carcinogène [105,106] et anti-inflammatoire [107,108].

De plus, comme les huiles essentielles sont des mélanges complexes de plusieurs composés, il est difficile d'attribuer leur activité biologique à un constituant particulier. Habituellement, les principaux composés sont ceux responsables des activités antifongiques de l'huile essentielle. L'activité des huiles essentielles et des hydrolats étudiées pourrait être expliquée par leurs compositions, elle est vraisemblablement due à la présence de tous ces composants.

### 3. Activité insecticide

L'activité insecticide des monoterpènes a été rapportée contre différents parasites de la culture agricole avec un effet potentiel fumigent [109,110].

L'huile essentielle de *Marrubium vulgare* a montré des effets insecticides remarquable, elle était efficace contre les stades larvaires de *Tuta. absoluta* insecte ravageur des tomates. La mortalité à 100% des larves et des adultes de tous les stades larvaires a été obtenue à une concentration d'huile de 20 µL/mL d'air. Si on examine donc les résultats de la toxicité des fumigents de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*, on constate que l'huile a montrée des activités très intéressantes. Habituellement, les sesquiterpènes qui sont les principaux composés de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* sont ceux responsables des ces activités larvicides. Cette activité larvicide est vraisemblablement due à la présence de tous ces composants, les autres sesquiterpènes mineurs identifiés dans notre huile comme le cadinène [111], l'oxyde de caryophyllène [112], le spathulénol [113,114] et le germacrène-D [115][66] sont souvent cités pour leur activité insecticide la plus élevée.

Cette présente étude indique que les extraits étudiés ont des activités anti-oxydantes, antifongiques et insecticides prometteuses. Ces huiles essentielles et hydrolats peuvent être utilisées comme source potentielle d'antioxydant naturelle, de fongicides botaniques écologiques respectueux de l'environnement pour protéger les tomates stockées contre les pathogènes, les champignons saprophytes et contre différents stades de vie de *Tuta. absoluta*, provoquant la bio-détérioration de divers produits alimentaires.

**Références bibliographiques**

- [1]. B. Pant, S. Manandhar. **2007**. *In-vitro* propagation of carrot (*Daucus carota*). *Sci. World J.* (5): 51.
- [2]. K. Schnaubelt. **2005**. Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts. *Int. J. Aromather.* (15): 98-105.
- [3]. B. Al-Safadi. **2008**. Characterization and distribution of *Daucus* species in Syria. *Biologia*.63 (2): 177-182.
- [4]. B. Pant, S. Manandhar. **2007**. *In-vitro* propagation of carrot (*Daucus carota*). *Sci. World*.(5):51-53.
- [5]. S.S. Cheng, M.T. Chua, E.H. Chang, C.G. Huang, W.J. Chen, S.T. Cheng. **2009**. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresour. Technol.* (100): 465-470.
- [6]. I. Telci, I. Demirtas, A. Sahin. **2009**. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*F. vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind. Crops Prod.* (30): 126-130.
- [7]. J. Kula, K. Izydorczyk, A. Czajkowska, R. Bonikowski. **2006**. Chemical composition of carrot umbells oils from *Daucus carota* ssp. *sativus* cultivated in Poland. *Flavour Fragance J.* (21): 667-669.
- [8]. P.G. Rossi, L. Bao, A. Luciani, J. Panighi, J.M. Desjobert, J. Costa, J. Casanova, J.M. Bolla, L. Berti. **2007**. (E)-Methyl isoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oils against *Campylobacter jejuni*. *J. Agric. Food. Chem.* (55): 7332-7336.
- [9]. M. Staniszewska, J. Kula. **2001**. Composition of the essential oil from Wild carrot umbels (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) Growing in Poland. *J. Essent. Oil Res.*(13): 439-441.
- [10]. M.A. Dib, N. Djabou, J.M. Desjobert, H. Allali, B. Tabti, A. Muselli, J. Costa. **2010**. Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Micro extraction as alternative technique to Hydrodistillation. *Chem. Cent. J.* 4:16.
- [11]. A. Lanfranchi, H. Laouer, M. El Kolli, S. Prado, C. Maulay-Bailly, N. Baldovini. **2010**. Bioactive Phenyl propanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J. Agric. Food. Chem.* (58): 2174-2179.

- [12]. H. Marzouki, A. Khaldi, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, P. Molicotti, S. Zanetti. **2010**. Essential Oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Nat. Prod. Commun.* (5): 1955-1958.
- [13]. T. Smaili, A. Zellagui, P.L. Cioni, G. Flamini. **2010**. A myristicin-rich essential oil from *Daucussahariensis* growing in Algeria. *Nat. Prod. Commun.* (6): 883-886.
- [14]. A. Jabrane, H. Ben Jannet, F. Harzallah-Skhiri, M. Mastouri, J. Casanova, Z. Mighri. **2009**. Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy, and *in vitro* Antibacterial Activity. *Chem. Biodivers.* (6): 881-889.
- [15]. H.E.A. Saad, S.H. El Sharkawy, A.F. Halim. **1995**. Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*. *Pharm. ActaHelv.* (70): 79-84.
- [16]. F. Mojab, A. Hamedi, B. Nickavar, K. Javidnia. **2008**. Hydrodistilled volatile constituents of the leaves of *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffman.) Arcang. (Apiaceae) from Iran. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 11(3): 271-277.
- [17]. P. Kainulainen, J. Tarhanen, K. Tiilikkala, J.K. Holopainen. **1998**. Foliar and Emission Composition of Essential Oil in Two Carrot Varieties. *J. Agric. Food. Chem.* (46): 3780-3784.
- [18]. M.G. Pinilla, M.J. Pérez-Alonso, A. Velasco-Negueruela. **1995**. Volatile constituents from fruits of *Daucus carota* L. *gummifer* Hook. fil. *J. Essent. Oil Res.* (7): 433-435.
- [19]. A.C. Tavares, M.J. Goncalves, C. Cavaleiro, M.T. Cruz, M.C. Lopes, J. Canhoto, L.R. Salgueiro. **2008**. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *J. Ethnopharmacol.* (119): 129-134.
- [20]. X. Imamu, A. Yili, H.A. Aisa, V.V. Maksimov, O.N. Veshkurova, Sh.I. Salikhov. **2007**. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Daucus carota sativa* Seeds. *Chem. Nat. Compd.* 43 (4): 495-496.
- [21]. WU Yin, Ze-Li. XU LIH, ong-jun. MENG X, iang-y ing. BAO, Yong-li, u-x in. LIY. **2006**. Components of Essential Oils in Different Parts of *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm. *Chem Res Chin Univ.* 22 (3): 328-334.
- [22]. A. Maxia, B. Marongiu, A.S. Piras, E. Porcedda, M.J. Tuveri, Gonçalves, C. Cavaleiro, L. Salgueiro. **2009**. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia.* (80): 57-61.
- [23]. M. Soković, D. Stojković, J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Ristić, D. Grubišić. **2009**. Susceptibility of pathogenic bacteria and fungi to essential oils of wild *Daucus carota*.

- Pharm. Biol.* 47 (1): 38-43.
- [24]. M.M. Özcan, J.C. Chalchat. **2007**. Chemical composition of carrot seeds (*Daucus carota* L.) cultivated in Turkey: characterization of the seed oil and essential oil. *Grasas y aceites*.58 (4): 359-365.
- [25]. D. Mockute, O. Nivinskiene. **2004**. The sabinene chemotype of essential oil of seeds of *Daucus carota* L. ssp. *carota* growing wild in Lithuania. *J. Essent. Oil Res.* (16): 277-281.
- [26]. R. Chizzola. **2010**. Composition of the Essential Oil from *Daucus carota* ssp. *carota* Growing Wild in Vienna. *J. Essent. Oil Res.* 13 (1): 12-19.
- [27]. N. Radulović, N. Đorđević, Z. Stojanović-Radić. **2010**. Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota*—A comparison study. *Food Chem.* (125): 35-43.
- [28]. S.B. Glisic, D.R. Misic, M.D.I.T. Stamenic Zizovic, R.M. Asanin, D.U. Skala. **2007**. Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity, *Food Chem.* (105): 3462-3470.
- [29]. J. Gora, A. Lis, J. Kula, M. Staniszewska, A. Wołoszyn. **2002**. Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants. *Flavour Fragrance J.* (17): 445-451.
- [30]. R.S.Verma, R.K. Verma, R.C. Padalia, A. Chauhan, A. Singh, H.P. Singh. **2011**. Chemical diversity in the essential oil of Indian Valerian (*Valeriana jatamansi* Jones). *Chem. Biodivers.* (8): 1921-1929.
- [31]. S.N. Syed Abdul Rahman, N. Abdul Wahab, S.N. Abdelmalek. **2013**. *In Vitro* Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evid Based Complement Alternat Med.* (20): 257108.
- [32]. A. Lapczynski, S.P. Bhatia, C.S. Letizia, A.M. Api. **2008**. Fragrance material review on geranyl linalool. *Food Chem. Toxicol.* (46): 176-178
- [33]. L. Price, S. Price. **2004**. Understanding hydrolats: The specific hydrosols for aromatherapy. Churchill Livingstone. 294.
- [34]. J. Tannous, R. El Khoury, S.P. Snini, Y. Lippi, A. El Khoury, A. Atoui, R. Lteif, I.P. Oswald, O. Puel. **2014**. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *International journal of food microbiology* (189): 51-60.
- [35]. J. Paolini. al. **2008**. Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by

- combination of GC/RI, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Natural Product Research*. 22 (14): 1270-1278.
- [36]. M.E.A. Dib, N. Djabou, H. Allali, J. Paolini, B. Tabti, J. Costa, A. Muselli. **2015**. Chemical Composition of Essential Oils and Hydrosol Extracts of *Daucus muricatus* and Assessment of Its Antioxidant Activity. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*.(21): 23–37.
- [37]. M. Nagy, E. Svajdlenka. **1998**. Comparaison des huiles essentielles de *Marrubium vulgare* L. et *M. peregrinum* L. *Journal of. Essentiel Oil Research*. (10): 585-587.
- [38]. M. Khanavi, L. Ghasemian, E. Hosseiny Motlagh, A. Hadjiakhoondi, A. Shafiee. **2005**. Composition chimique des huiles essentielles de *Marrubium parviflorum* Fisch. & CALIFORNIE. Mey et *Marrubium vulgare* L. de l'Iran. *Flav. Fragr. J.* (20): 324-326.
- [39]. K. Morteza-Semnani, M. Saeedi, E. Babanezhad. **2008**. Composition de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. d'Iran. *Journal of Essential Oil*. (20): 488-490.
- [40]. A. Asadipour, M. Mehrabani, V. Nazeri, M. Tabarraii. **2005**. Composition de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. *Ulm-i-Daroei*. (2): 77-82.
- [41]. M.M. Saleh, K.W. Glombitza. **1989**. huile volatile de *Marrubium vulgare* et son activité anti-schistosomique. *Planta Med.* (55): 105.
- [42]. A. Kadri, Z. Zarai, A. Békir, N. Gharsallah, M. Damak, R. Gdoura. **2011**. Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. de Tunisie. *Revue Africaine de Biotechnologie*. (11): 19 .
- [43]. W. Hamdaoui. Marley, B. Marzouk, N. Ben Brahim, B. Marzouk. **2013**. Composition des huiles essentielles de deux espèces de perroquets tunisiens: *Marrubium vulgare* L. et *Marrubium aschersonii*. *Magnus*. (16): 608-612.
- [44]. C. Santos, P.A.G. Costa, M.M. Barroso, J.G. Pedro, LG. **2006**. Composition des huiles essentielles et trichomes glandulaires de *Marrubium vulgare* L. Sauvages en Algérie. *Journal of Essential Oil Research*. (18): 369-373.
- [45]. A.C. Tavares, M.J. Gonçalves, C. Cavaleiro. **2008**. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *Halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethno pharmacol.* (119): 129-134.
- [46]. N.S. Sangwan, A.H.A. Farooqi, F. Shabih, R.S. Sangwan. **2001**. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*. (34): 3-21.
- [47]. N.S. Kim, D.S. Lee. **2004**. Headspace solid-phase micro extraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas

- chromatography-mass spectrometry. *J Separat Sci.* (27): 96-100.
- [48]. G. Circella, C. Franz, J. Novak, H. Resch. **1995**. Influence of day length and leaf insertion on the composition of marjoram essential oil. *Flavour Fragr J.* (10): 371-374.
- [49]. M. Skoula, J.E. Abbes, C.B. Johnson. **2000**. Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete. *Biochem Sys Eco.*(28): 551-561.
- [50]. K.H.C. Baser, F. Demirci. **2007**. Essential oil chemistry, in: R.G. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrance: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Springer, Berlin. 42-86.
- [51]. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, **2008**. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol* (46): 446-475.
- [52]. Z. Kazemizadeh, T. Amini, F. Nazari, Z. Habibi. **2009**. Volatile constituents of *Ballota nigra* subsp. *anatolica* from Iran. *Chem Nat Compd. J.* 45 (5): 737-8.
- [53]. A. Bader, C. Caponi, P. Cioni, G. Flamini, M. Ivano. **2003**. Composition of the essential oil of *Ballota undulata*, *B. nigra* ssp. *foetida* and *B. saxatilis*. *Journal of Flavour Fragrance J.*18(6): 502-4.
- [54]. E. Amiel, R. Ofir, N. Dudai, E. Soloway, T. Rabinsky, S. Rachmilevitch. **2012**. beta-Caryophyllene, Compound Isolated from the Biblical Balm of Gilead (*Commiphora gileadensis*), Is a Selective Apoptosis Inducer for Tumor Cell Lines. *Evid Based Complement Alternat Med.* 872394.
- [55]. K. Morteza-Semnani, M. Saeedi, M. Akbarzadeh. **2007**. The essential oil composition of *Ballota nigra*. *Chem Nat Compd. J.* 43 (6):722-3.
- [56]. A. Bela, B. Zarasagozi, I. Belda, J.E. Martinez, E. Seva. **2013**. Traditional knowledge of medicinal plants in the serra de Meriola Natural Park, South-Eastern Spain. *Afr j Tradit complement Altern Med.*10 (2): 299-309.
- [57]. I. Raskin, D.M. Ribnicky, S. Komarnytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D.A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J.M. O’Neal, T. Cornwell, I. Pastor, B. Fridlender. **2002**. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* (20): 522–531.
- [58]. J.L. Rios, M.C. Recio. **2005**. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* (100): 80- 84.
- [59]. A. Mohagheghzadeh, P. Faridi, M. Shams-ardakani, Y. Ghasemi. **2006**. Medicinal smokes. *J. Ethnopharmacol.* (108): 161-184.



- [60]. R. Gulland. **1923**. *J. Chem. Soc.* London. (23):980.
- [61]. M. Gates, G. Tschudi. **1952**. The synthesis of morphine. *Journal of the American Chemical Society* *J. 74.* (4): 1109-1110.
- [62]. J. D. Mc Chesney, S.K. Venkataraman, J.T. Henri. **2007**. Plant natural products: back to the future or into extinction. *Phytochemistry J.* 68 (14): 2015-2022.
- [63]. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. **2008**. Biological effects of essential oils. a review. *Food and chemical toxicology.*46 (2): 446-475.
- [64]. S. Burt. **2004**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International journal of food microbiology,* 94 (3): 223-253.
- [65]. R. Gambari, **2011**. Predictive analyses of biological effects of natural products: from plant extracts to biomolecular laboratory and computer modeling. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- [66]. G. Ruberto, M.T. Baratta. **2000**. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food chemistry.* 69 (2): 167-174.
- [67]. K. Schnaubelt. **2005**. Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts. *Int. J. Aromather.* (15): 98-105.
- [68]. A. Amiri, R. Dugas, A. L. Pichot, G. Bompeix. **2008**. *In-vitro* and *in-vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*(126): 13-19.
- [69]. N. Ozbay, S.E. Newman. **2004**. *Fusarium* crown and root rot of tomato and control methods. *Plant Pathol J* , (3): 9–18.
- [70]. A. Ouelhadj, K. Beddar, D. Djenane. Chemical composition and Antifungal activity of the *Myrtus communis* and *Pistacial entiscus* essential oils of Mediterranean regions in laboratory medium and Strawberry fruit.
- [71]. J. L. Maas. Compendium of strawberry diseases. **1998**. 2nd ed. APS Press, St. Paul
- [72]. P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, S. Satya. **2014**. Bio- control potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotox Environ Safe*, (100): 1-6.
- [73]. J. Tian, X. Ban, H. Zeng, J. He, B. Huang, Y. Wang. **2011**. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak.*Int. J. Food Microbiol.* (145): 464-470.
- [74]. W. Feng, J. Chen, X. Zheng, L. Liu. **2011**. Thyme oil to control *Alternaria alternata* *in-vitro* and *in-vivo* as fumigant and contact treatments. *Food Control.* (22): 78-81.
- [75]. W. Feng, X.D. Zheng. **2007**. Essential oils to control *Alternaria alternata in-vitro* and

- in-vitro*. *Food Control*. (18): 1126-1130.
- [76]. M.D. Antunes, A.M. Cavaco. **2010**. The use of essential oils for postharvest decay control. *A review. FlavourFragr. J* (25): 351-366.
- [77]. E.M. Soylu, Ş.Kurt, S. Soylu. **2010**. *In-vitro* and *in-vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food. Microbiol.* (143): 183-189.
- [78]. M.V. Bhaskara Reddy, P. Angers, A. Gosselin, J. Arul. **1998**. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*. (47): 1515–152.
- [79]. A. Asghari-Marjanlo, Y. Mostofi, S.H. Shoeibi, M. Fattahi. **2009**. Effect of cumin essential oil on postharvest decay and some quality factors of strawberry. *J. Med.* (8): 25–43.
- [80]. M. Zamani-Zadeha, S. Soleimanian-Zadb, M. Sheikh-Zeinoddina, S.A. Amir-HosseinGoli. **2014**. Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit. *Post-Harvest Biology*. (92): 149–156.
- [81]. S. Mohammadi, A. Hossein, M.H. Aminifard, V. Jahanbakhsh. **2012**. *In-vitro* and *in-vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against strawberry grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Arch Phytopathology Plant Protect*,45 (20): 2474-2484
- [82]. S. Kilani, I. Bouhlel, R. Ben Ammar, I. Ben Sghair Skandrani, J. Boubaker, A. Mahmoud, M.G. Dijoux-Franca, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira. **2007**. Chemical investigation of different extracts and essential oil from the tubers of (Tunisian) *Cyperus rotundus*. Correlation with their antiradical and antimutagenic properties. *Ann. Microbiol.* (57): 657–664.
- [83]. L.S.T. Ngamo, Th. Hance. **2007**. Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical, *Tropicultura*, 25 (4): 215-220.
- [84]. T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, M. Milos. **2004**. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* (85): 633–640.
- [85]. J. K. Moon, T. Shibamoto. **2009**. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (57): 1655-1666.
- [86]. C.L. Ho, E.I.C. Wang, H.T. Yu, H.M. Yu, Y.C. Su. **2010**. Compositions and antioxidant activities of essential oils of different tissues from *Cryptomeria japonica* D. Don. 林業研究季刊 32 (1): 63-76.

- [87]. F. Conforti, G. Statti, D. Uzunov, F. Menichini. **2006**. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurusnobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) coutinho seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29 (10): 2056-2064.
- [88]. T. Kulisic, V. Radonic, M. Milos. **2005**. Inhibition of lard oxidation by fractions of different essential oils. *Grasas y Aceites*.(56): 284-291.
- [89]. S.S. Pekkarinen, I.M. Heinonen, A.I. Hopia. **1999**. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *J Sci Food Agric*. (79): 499-506.
- [90]. I.I. Koleva, T.A. Van Beek, J.P.H. Linssen, A. de Groot, L.N. Evstatieva. **2002**. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* (13): 8-17.
- [91]. Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, B.D. Oomah. **1998**. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural Food Chemistry* (46): 4113-4117.
- [92]. L. Gachkar, D. Yadegari, M.B. Rezaei, M. Taghizadeh, S.A. Astaneh, I. Rasooli. **2007**. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinu officinalis* essential oils. *Food Chem*. (102): 898-904.
- [93]. M.R. Foolad, D.R. Panthee. **2012**. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Crit. Rev. Plant Sci*. 31(2): 93-123.
- [94]. R. Croteau, R.E. Ketchum, R.M. Long, R. Kaspera, M.R. Wildung. **2006**. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem. Rev*. (5): 75-97.
- [95]. S. Kordali, A. Cakir, T.A. Akcin, E. Mete, A. Akcin, T. Aydin, H. Kilic. **2009**. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Ind. Crop Prod*. (29): 562-570.
- [96]. N.G. Tzortzakis. **2010**. Ethanol, vinegar and *Origanum vulgare* oil vapour suppress the development of anthracnose rot in tomato fruit. *Int. J. Food Microbiol*. (142): 14-18.
- [97]. S. Lee, R. Tsao, C. Peterson, J.R. Coats. **1997**. Insecticidal activity of monoterpenes to western corn root worm (*Coleoptera: Chrysomelidae*), two spotted spider mite (*Acari: Tetanychidae*), and house fly (*Diptera: Muscidae*). *J. Econ. Entomol*. (90): 883-892.
- [98]. B. M. Fraga. **2004**. Natural sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep*. (21): 669-693.

- [99]. K. Bauer, D. Garbe, H. Ssurburg. **1991**. Common Fragrance and Flavor Materials, VCH Publishers, Weinheim, Germany, 2nd edition.
- [100]. M. Sköld, A. Karlberg, M. Matura, A. Börje. **2006**. The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene air oxidation and skin sensitization. *Food Chem. Toxicol.* 44 (4): 538-545.
- [101]. M.O. Omolo, D. Okinyo, I.O. Ndiege, W.L. Lwande, A. Hassanali. **2004**. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochem.* (65): 2797-2802.
- [102]. J.M. Rodilla, M.T. Tinoco, J.C. Morais, C. Gimenez, R. Cabrera, D. Martín-Benito, L. Castillo, A. Gonzalez-Coloma. **2008**. *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. *Biochem. Syst. Ecol.* (36): 167-176.
- [103]. S.S. Cheng, C.L. Wu, H.T. Chang, Y.T. Kao, S.T. Chang. **2004**. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. *J. Chem. Ecol.* (30): 1957-1967.
- [104]. N. Ghelardini, L.D.C. Galeotti, G. Mannelli, A. Mazzanti. **2001**. Bartolini Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. *Il Farmaco.* (56): 387-389.
- [105]. I. Kubo, S.K. Chaudhuri, Y. Kubo, Y. Sanchez, T. Ogura, T. Saito, H. Ishikawa, H. Haraguchi. **1996**. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterothecainuloides*. *Planta Med.* (62): 427-430.
- [106]. S.L. Silva, P.M. Figueiredo, T. Yano. **2007**. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. *Eur. J. Pharmacol.* (576): 180-188.
- [107]. A. Di Sotto, G. Mazzanti, F. Carbone, P. Hrelia, F. Maffei. **2010**. Inhibition by  $\beta$ -caryophyllene of ethyl methane sulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* (699): 23-28.
- [108]. Y.T. Tung, M.T. Chua, S.Y. Wang, S.T. Chang. **2008**. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous *Cinnamon* (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresour. Technol.* (99): 3908-3913.
- [109]. S.A.M. Abdelgaleil, M.I.E. Mohamed, M.E.I. Badawy, S.A.A. El-arami. **2009**. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetyl cholinesterase activity. *J. Chem. Ecol.* (35): 518-525.
- [110]. S.S. Nathan, M.Y. Choia, H. Seoa, C.H. Paika, K. Kalaivania, J.D. Kim. **2008**. Effect of *azadirachtin* on *acetylcholin esterase* (AChE) activity and histology of the brown plant hopper *Nilaparva talugens* (Sta<sup>o</sup> 1). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (70): 244-250.

- [111]. M.J. Chavan, P.S. Wakte, D.B. Shinde. **2010**. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona quamosa* L. bark. *Phytomedicine*. (17): 149-151.
- [112]. C.L. Wu, S.C. Chien, S.Y. Wang, Y.H. Kuo, S.T. Chang. **2005**. Structure-activity relationships of cadinane-type sesquiterpene derivatives against wood-decay fungi. *Holzforschung*. (59): 620-627.
- [113]. A. Ali, N. Tabanca, B. Demirci, E.K. Blythe, A. Zulfiqar, K. Husnu, C. Baser, I.A. Khan. **2015**. Chemical Composition and Biological Activity of Four *Salvia* Essential Oils and Individual Compounds against Two Species of Mosquitoes. *J. Agric. Food. Chem.* (63): 447-456.
- [114]. C. Bougatsos, O. Ngassapa, D.K.B. Runyoro, I.B. Chinou. **2014**. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Z. Naturforsch.* (59): 368-372.
- [115]. L. Zhu, Y.J. Tian. **2011**. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil of *Blumea martiniana* against *Anopheles anthropophagus*. *Asian Pacific. J. Trop. Med.* 4 (5): 371-374.

## *Conclusion générale*

## Conclusion générale

---

Ce travail de thèse a pour objectif principal de contribuer à une meilleure gestion et protection de ressources alimentaire par la valorisation des ressources végétales (huiles essentielles et extraits des hydrolats), vue que la filière des huiles essentielles est un créneau potentiellement lucratif, il dispose de réelles perspectives de développement et s'inscrit dans une démarche de développement durable.

Afin de valoriser ces huiles essentielles et ces extraits d'hydrolats, ce travail passe par des étapes nécessaire: l'extraction, la détermination de la composition chimique, la mise en évidence d'une éventuelle spécificité et la valorisation des coproduits d'extraction (hydrolats). Les huiles essentielles et les extraits des hydrolats se présentent sous la forme de mélanges complexes. Cette complexité résulte de la diversité structurale et fonctionnelle des constituants qui paradoxalement sont construits à partir de la même entité (synthon isoprénique).

Dans ce contexte, et afin de participer à la diversification de la gamme des huiles essentielles produites par les plantes aromatiques et au développement de la filière PAM dans la région de l'Ouest Algérien,

Ce travail de thèse repose sur l'étude de la composition chimique des huiles essentielles produites par quatre plantes aromatiques: *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum cheirifolium* de la région de Tlemcen.

Nous nous sommes également intéressés aux hydrolats qui font l'objet depuis quelques années, d'un intérêt croissant. La caractérisation de cette phase aqueuse (co-produit de l'huile essentielle) chargée en composés hydrosolubles, s'inscrit aussi dans une démarche de production plus écologique en valorisant une matière jusqu'alors considérée comme un effluent.

Ce travail de thèse engendre donc deux parties complémentaire, un travail d'extraction et de caractérisation et un autre d'application et de valorisation.

- Aspect extraction et caractérisation:
  - i. de préparer des extraits d'huiles essentielles et des hydrolats pour l'analyse de leurs constituants.
  - ii. de réaliser l'étape cruciale de détermination de la composition chimique de ces mélanges complexes naturels, par deux techniques chromatographiques qui sont traditionnellement utilisées (CPG et CPG/SM). une étude détaillée de la composition chimique de tous les échantillons des huiles essentielles et des extraits d'hydrolats a été réalisé.

## Conclusion générale

---

- Au niveau appliqué:
  - i. donner lieu à de nouvelles sources de produits naturels alternatives pour la conservation des aliments, et pour la lutte contre les insectes dans les industries agroalimentaires,
  - ii. de permettre de valoriser ces extraits par l'étude de leur différente activité biologique, anti-oxydante, antifongique et insecticide.

L'étude menée sur la variabilité chimique de *Daucus. carota ssp. sativus* a été discutée à l'aide d'une analyse statistique. Selon leurs principales composantes, deux principaux groupes d'huiles essentielles ont été trouvés (l'un issu des racines et l'autre des huiles essentielles pour les parties aériennes). Cette étude a également mis en évidence la spécificité régionale des principaux composants caractérisés par la présence de deux composantes majeures: le géranyl linalol dans l'huiles des racines et l'alismol dans l'huiles des parties aériennes, jamais décrit comme composés majoritaires dans les huiles essentielles des espèces de *Daucus* d'origines diverses.

D'autre part l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*, recueillie dans la station de Beni-Snous au cours des trois saisons (hiver, printemps et été), a été comparée en termes de composition d'huile essentielle et de rendements. On a surtout observé des variations quantitatives plutôt que qualitatives dans la composition de l'huile. Des variations considérables ont été observées pour le E- $\beta$ -caryophyllène (4,5-23,5%), le E- $\beta$ -farnesène (3,4-22,9%) et l' $\alpha$ -humulène (tr-14,8%). L'analyse de l'extrait de l'hydrolat *Marrubium vulgare* montre que sa composition est très différente de celle de l'huile essentielle correspondante, il est caractérisé par la présence des composés oxygénés quantitativement très faibles dans l'huile essentielle.

En ce qui concerne l'huile essentielle des parties aériennes de *Ballota nigra*, elle est principalement composée par des sesquiterpènes hydrocarbonés (53.1%).

L'analyse de son extrait d'hydrolat a permis la mise en évidence des monoterpènes oxygénés (71.5%), classe de composés présent dans l'huile essentielle en quantité très faible.

L'huile essentielle de *Cynoglossum cheirifolium* renferme en majorité des alcanes et des monoterpènes hydrocarbonés. Alors que son extrait d'hydrolat est caractérisé par la présence majoritaire de monoterpènes oxygénés classe de composés absente dans l'huile essentielle.

Afin de valoriser ces huiles essentielles et extraits des hydrolats, et dans le but de trouver des nouveaux produits bioactifs naturels, les activités antifongique *in vitro* et *in vivo*, ainsi que les



## Conclusion générale

---

activités anti-oxydantes des huiles extraite des quatre plantes et l'activité insecticide de l'huile de *Marrubium vulgare* ont été étudiées.

Les tests de l'activité anti-oxydante ont montré que presque tous les extraits étudiés possèdent une activité anti-oxydante. L'huile essentielle des racines du *Daucus. carota ssp. sativus* a montré la plus forte activité anti-oxydante qui est proche de l'acide ascorbique, alors que celle de l'huile de *ballota* a montré aussi une activité anti-oxydante importante qui est proche à celle de BHT. L'huile de *Cynoglossum cheirifolium* et celle de *ballota* a montré également une activité modérée.

Par ailleurs, on a constaté que les quatre huiles essentielles inhibaient la croissance de *Penicillium expansum* et d'*Alternaria alternata* responsable des maladies fongique des tomates de manière dose-dépendante avec des pourcentages d'inhibition très intéressant allant jusqu'à 100% avec une concentration de 30 mL/L. De même les souches *B. cinerea* et *P. expansum* responsable des maladies fongiques de fraises ont été inhibé complètement par l'huile de *Daucus. carota ssp. sativus*.

Des essais *in vivo*, de nos huiles essentielles et des hydrolats ont montré également une très importante activité de protection contre la pourriture noire des tomates causée par *A. Alternata*, jusqu'à 15-20 jours de stockage respectivement, par rapport au témoin.

De même les traitements des fruits de fraise avec l'huile essentielle des racines du *Daucus. carota ssp. sativus*. (0,01 mL/L d'air) et son extrait d'hydrolat (0,1 mL/L) ont présenté un meilleur effet préventif et protecteur pendant 7 jours de stockage.

L'application de ces huiles essentielles et d'extraits hydrolats pourraient devenir donc une alternative réussie aux fongicides traditionnels utilisés dans la gestion post-récolte des tomates et des fraises contre les maladies fongiques.

Enfin concernant l'activité insecticide, les essais de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* ont révélés une bonne toxicité fumigent. À la concentration de 20 mL/L d'air, l'huile a causé une mortalité supérieure à 100% pour tous les stades larvaires et adultes de *Tuta. absoluta* insecte ravageurs des tomates, après 24 h d'exposition.

Ainsi, l'huile essentielle peut être utilisée comme une source potentielle pour développer des agents de contrôle pour gérer certains des principaux parasites de la tomate.

A l'issue de ces travaux menés tout au long de cette thèse, et des résultats promoteur obtenues. Un certain nombre de pistes de recherche sont à notre portée et méritent d'être exploitées. En voici quelques-unes:

- L'extrapolation de ces résultats et le développement de ces procédés à l'échelle industrielle nous semblent très importants dans plusieurs domaines tels que les

## Conclusion générale

---

industries agro-alimentaire vue les résultats très intéressants des activités antifongiques des huiles et des hydrolats.

- La valorisation des extraits des hydrolats par de nouvelles technologies pour des tests sur d'autres activités biologiques car d'un point de vue industriel, l'hydrolat, ce coproduit de l'huile essentielle qui contient plusieurs constituants oxygénés dans une phase aqueuse présente un intérêt majeur vu le coût et le faible rendement en huiles essentielles.
- Le fractionnement de ces extraits des huiles essentielles et l'identification des molécules responsables de la meilleure activité.

## *Publications*

# Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage

Amina Tabet Zatla, Mohammed El Amine Dib, Nassim Djabou, Faiza Ilias, Jean Costa & Alain Muselli

To cite this article: Amina Tabet Zatla, Mohammed El Amine Dib, Nassim Djabou, Faiza Ilias, Jean Costa & Alain Muselli (2017): Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage, *Journal of Essential Oil Research*

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2017.1322008>



Published online: 09 May 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage

Amina Tabet Zatl<sup>a</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>b</sup>, Nassim Djabou<sup>a</sup>, Faiza Ilias<sup>c</sup>, Jean Costa<sup>d</sup> and Alain Muselli<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Université de Tlemcen, Tlemcen, Algeria; <sup>b</sup>Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, Tlemcen, Algeria; <sup>c</sup>Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Faculté des Sciences de la Nature, de la Vie, et des Sciences de la Terre et l'Univers, Université de Tlemcen, Tlemcen, Algeria; <sup>d</sup>Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, Corte, France

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the chemical composition of essential oils and hydrosol extract of *Daucus carota* subsp. *sativus*, and as well as their biological activities. The major compounds of root oil were geranyl linalool (50.3%). Aerial parts essential oil was made of alismol (15.2%),  $\alpha$ -humulene (9.5%) and  $\beta$ -ionone (8.2%). The main components of root hydrosol extract were myristicine (17.8%), (E)-methyl-iso-eugenol (16.6%) and methyl-eugenol (11.9%). Furthermore, caryophyllene oxide (9.8%) and p-cymen-8-ol (8.9%) were the major compounds of hydrosol extract from aerial parts. The hydrosol extract of roots produced the best inhibition against *P. expansum* and *B. cinerea*. While, essential oil of roots was inhibitory at relatively higher concentrations. Results showed that the treatments of strawberry fruit with roots essential oil and hydrosol extract of *D. carota* subsp. *sativus* presented a very interesting protective and preventive activity on strawberry against *B. cinerea* mould.

### ARTICLE HISTORY

Received 7 January 2016  
Accepted 13 April 2017

### KEYWORDS

*Daucus carota* subsp. *sativus*;  
essential oils; hydrosol  
extracts; strawberry fruit;  
*Botrytis*

### Introduction

Post-harvest losses particularly due to fungal invasions are much more significant for highly perishable fresh fruits and vegetables than field crops. The reasons for post-harvest losses can generally be ascribed to pathological breakdown due to fungal and bacterial infections, pathophysiological injuries during storage due to excessive chilling or lighting or to anomalies in the atmospheric gaseous composition, and physical injury, such as mechanical damage (1). The use of synthetic fungicides is one of the most common methods to protect plant crops, especially fruit, in the postharvest phase. On the other hand, the development of resistance in pathogenic microorganisms and effects on health and the environment, led researchers to develop new and effective methods, which are regarded as safe and eco-friendly, to control postharvest diseases (2). Strawberry is a particularly perishable fruit during postharvest storage. Natural or GRAS compounds are substances that are known not to be harmful to the environment and to human health, and these are used for their

antimicrobial and antifungal properties. Essential oils of plants and their terpenoids, have many applications in folk medicine, food preservation as well as in pharmaceutical industries (3,4). Many studies have been conducted to show antifungal activities *in vivo* of essential oils against pathogenic fungi responsible for food spoilage (5–9). However, very few studies have documented the antifungal effects of plant essential oils to control strawberry fruit fungi *in vivo* (10–12). Investigations showed that the thyme oil, cumin oil and combined treatments with *Lactobacillus plantarum* + cumin oil and *Lactobacillus plantarum* + thyme oil resulted in an important control of *Botrytis* infections of strawberry fruit. According to (13), application of fennel, anis, peppermint and cinnamon oils showed that all these essential oils caused an increase in the shelf life of fruits and inhibited *Botrytis cinerea* growth as compared to the controls. Hydrosols are by-products obtained during essential oil distillation. They are valuable extracts not only for cosmetic industries but also for post-harvest treatment of mushrooms and fertilization of soils

(14). To our best knowledge there are no reports about the *in vitro* and *vivo* antifungal activities of the hydrosol extracts and essential oils of *Daucus carota* subsp. *sativus*. This work is a part of our continuing programme aiming isolating compounds and extracts that might control fungal diseases. This is done through a few steps such as determining the chemical composition of essential oils from aerial parts and roots from western Algerian flora, their activity against three fungi and their potential *in vivo* activity against *B. cinerea*.

## Materials and methods

### Plant material and essential oil isolation

The roots and total aerial parts of *D. carota* subsp. *sativus* were harvested from Mostaganem region, Northwest of Algeria (35°54'22" N and 0°8'45" E) in March 2014. The plants collected were identified by the Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of the University of Tlemcen (Algeria). A voucher specimen was deposited in this laboratory (D.C 08.2014). A portion of each organ was stored at 4°C for eventual further studies. The essential oils were obtained by steam distillation for 5 h using Clevenger-type apparatus. The yields of the oils were, respectively, 0.2% from roots and 0.03% from the aerial parts.

### Hydrosol extracts prepared by liquid-liquid extraction

For each separated organ (roots and total aerial parts) of *D. carota* subsp. *sativus*, air-dried plant materials (1 kg) were submitted to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 5 h. The first litre of water from hydrodistillation was recovered in order to obtain the corresponding hydrosols. Each hydrosol was extracted three times with 200 mL of diethyl ether at room temperature. The organic layer was evaporated and dried on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, giving yellowish oil with yields of 0.12 and 0.14% for the root and aerial parts, respectively, for the root and aerial parts, respectively.

### Gas chromatography

GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60 to

230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL/min); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software.

### Gas chromatography-mass spectrometry

Samples were analysed with a Perkin-Elmer Turbo Mass quadrupole analyzer, coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with two same fused-silica capillary columns and operated with the same GC conditions described above, except for a split of 1/80. Electronic Impact (EI) mass spectra were acquired under the following conditions: Ion source temperature 150°C, energy ionization 70 eV, mass range 35–350 Da (scan time: 1 s).

### Component identification and quantification

Identification of the components was made (i) through the comparison of their GC retention indices (RI) on non-polar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data (15–17) and (ii) also through computer matching with commercial mass spectral libraries (18–20) and comparison of spectra with those of in-house laboratory library. Component quantification was carried out using peak normalization % abundances calculated by integrating FID response factors relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard.

### Pathogenic fungal strains

*Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* and *B. cinerea* were obtained from a strawberry greenhouse by harvesting from diseased fruits and maintained in potato dextrose agar (PDA, Sigma-Aldrich, USA) in a growth chamber at 23°C for 14 days in the darkness. Each isolate was purified by a single spore isolation technique and identified based on cultural and morphological characteristics (21,22). The conidia were obtained from the surface of the agar and suspended in 5 mL of sterile distilled water containing 0.1% v/v Tween 80. Spore suspensions were filtered through four layers of sterile cheesecloth to remove mycelial fragments. The number of spores was calculated with an automated cell counter (Bio-Rad's TC20), Cellometer Vision and the spore concentration was adjusted to 1 × 10<sup>6</sup> spores/mL with the aid of a haemocytometer prior to use (23).

### **In vitro antifungal assay**

Antifungal activity of the essential oils and hydrosol extracts was tested against the aforementioned strains. The method used was a modification of Tian et al. (5), which was based on a method published by Singh et al. (24). Aliquots of extracts dissolved separately in 0.5 ml of 10% (v/v) DMSO were pipetted aseptically to 9 cm glass Petri dishes containing 9.5 ml of molten PDA to procure the requisite concentrations of essential oils (30 and 70 mL/L for roots and 100 and 400 mL/L for aerial parts) and hydrosol extracts (0.1 mL/L for roots and 0.14 mL/L for aerial parts). Control plates (without essential oils and hydrosol extracts) were inoculated following the same procedure. A 9 mm fungal disc of mycelial material, cut from the periphery of a five-day-old culture with a sterile cork borer, was inoculated aseptically to the centre of the prepared treatment and control Petri dishes. The plates were sealed with polyethylene film and incubated at a temperature of 27°C. The efficacy of the treatment was evaluated each day for 7 days by measuring the average of two perpendicular diameters of the colony. All tests were performed in triplicate. Percentage inhibition of the radial growth of the tested fungi by the oil and hydrosol extract compared with the control was calculated at day seven, using the following formula (25):

$$I\% = \left[ \frac{DC - DT}{DC} \right] \times 100$$

where DC and DT are average diameters of fungal colony of control and treatment, respectively.

### **Activities of essential oil and hydrosol extract from roots of *D. carota* subsp. *sativus* on the conservation of strawberry fruits**

The method of Tian et al. (26) was used and slightly modified to determine the effects of essential oil and hydrosol extract on wound-inoculated (protective activity) and non-inoculated (preventive activity) strawberry fruits. For each test, five uniform strawberries were selected for uniformity in size, appearance, ripeness and the absence of physical flaws. To determine the protective effect of essential oil and hydrosol extract on wound-inoculated fruits, the selected strawberry fruits for the experiments were washed in water, dipped in ethanol (70%) for 2 min, rinsed twice with double distilled sterile water (10 min each) and air-dried. Surface-sterilized strawberry fruit was wounded with a flame-sterilized nail to a uniform depth of 3 mm. The fungal inoculum containing  $10^6$  spores/mL was prepared by scraping spore material from the surfaces of the colonies with a wet cotton swab and re-suspending it in distilled water containing 0.5% Tween 80. In order to not distort the

taste and odour of fruits, a low concentration of essential oil (0.01 mL), was applied onto filter paper disc of 4 cm diameter and placed into polystyrene container (1 L), to get a final concentration of 0.01 mL/L air (without using any solvent). For the hydrosol extract, the strawberry fruits were washed with the hydrosol (0.1 mL/L that is 0.1 mL of hydrosol extract in 1L of water) and placed directly in polyethylene-lined plastic boxes. All the containers with snap on-lids were then stored at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  for seven days with a pressure of 692 mm Hg and humidity of 60%. For preventive activity, strawberry fruits were randomly separated without inoculation and were treated with oil (0.01 mL/L air) and hydrosol extract (0.1 mL/L) as described above. Control experiments were performed in which the essential oil and hydrosol extract treatment was removed. The experiments were carried out three times. The percentage disease index of infection on the strawberry fruits was determined using the formula:

$$DI(\%) = \frac{\text{TNI}}{N} \times 100$$

where, = TNI: Total number of infected strawberry fruits and  $N$  = total number of strawberry fruits Assessed (27).

### **Taste panel**

Sensory evaluation of strawberry fruits treated with essential oil and hydrosol extract was assessed by a group of twenty untrained panellists. Panellists were selected among students and staff of our laboratory. Strawberry fruits samples exposed to essential oil (0.01 mL/L Air) and washed with hydrosol extract (0.1 mL/L) for 24 h were given to panellists to taste. The panellists were required to evaluate flavour and odour of the strawberry fruit on a scale from 5 to 1, where 1 = strongly dislike, 2 = dislike, 3 = neither like nor dislike, 4 = like; 5 = strongly like, according to a previous reports (28). A general taste score was calculated as the average of all grades. Results were expressed as average grades given by twenty panellists.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis of variance (ANOVA) was performed using the SAS software and means were separated using the Least Significant Difference (LSD) test at  $P \leq 0.05$ . Analysis of each test was performed in triplicate.

## **Results**

### **Chemical compositions of essential oil**

The gas chromatographic profiles of the essential oils obtained from the roots and aerial parts of *D. carota*

*subsp. sativus* contained a wide variety of compounds. Analyses of the essential oils identified 86 compounds which accounted for 92.7 and 95.2% of the root and aerial parts essential oils, respectively. Their retention indices and their normalized % abundances are shown in Table 1. All compounds were identified by comparison of their EI-MS and GC-Retention Indices with those of our laboratory-produced 'Arômes' library, with the exception of ten compounds that were identified by comparison with spectral data and retention indices from the literature (see Table 1). Two essential oil types were produced by *D. carota* subsp. *sativus*. The essential oils from roots were mainly made of oxygenated compounds (74.0%) and oil from the aerial parts mainly contained hydrocarbons (53.1%) and oxygenated compounds (38.8%). The main components from root essential oils were geranyl linalool (50.3%) followed by pentacosane (7.1%). Conversely, the main components of the essential oils of the aerial parts were sesquiterpenes (50.1%) that is alismol (15.2%),  $\alpha$ -humulene (9.5%),  $\beta$ -ionone (8.2%), (E)- $\beta$ -caryophyllene (5.5%), spathulenol (4.9%), caryophyllene oxide (4.1%) and neophytadiene (4.3%).

### Chemical composition of hydrosol extracts

Using liquid-liquid extraction (LLE), the total number of chemical compounds identified so far in hydrosol extracts was forty in roots and forty-four in aerial parts, accounting for 93.3 and 98.3% of the total extract composition, respectively (Table 1). Root hydrosol extract was dominated by phenolic compounds (59.7%) such as myristicine (17.8%), (E)-methyl-iso-eugenol (16.6%), methyl-eugenol (11.9%) and eugenol (7.9%), followed by oxygenated compounds, represented by gamma-decalactone (7.8%) and octadecanoic acid (6.3%). The hydrosol extract from aerial parts was characterized by oxygenated sesquiterpenes (38.3%), such as caryophyllene oxide (9.8%),  $\alpha$ -bisabolol (7.9%), humulene epoxide II (6.6%), geranyl linalool (5.6%) and zingiberenol 2 (4.7%). The following identified phenolic compounds were p-cymen-8-ol (8.9%), 4-methyl-acetophenone (5.6%) and phenyl acetaldehyde (3.6%), while identified oxygenated monoterpenes were  $\gamma$ -decalactone (6.8%) and geranyl acetone (5.6%) (Table 1).

### Antifungal activity of essential oils and hydrosol extract against plant fungi

The inhibitory effects of essential oils and hydrosol extracts from roots and aerial parts were evaluated against three plant fungi namely *P. expansum*, *A. niger* and *B. cinerea* (Table 2). The data indicate that essential oil of roots at concentration of 70 mL/L produced the greatest inhibition (100%) for *P. expansum* and *B. cinerea*. At

the concentration of 0.1 mL/L, the root hydrosol extract showed potent inhibitory effect on the growth of *P. expansum* (88.9%) and *B. cinerea* (86.5%), as shown in Table 2. On the other hand, the essential oils and hydrosol extract of aerial parts had no effect against *P. expansum*, *A. niger* and *B. cinerea*.

### Effect of the essential oil and hydrosol extract roots on disease development in vivo conditions

Due to the promising results of *in vitro* tests, essential oil and hydrosol extract from roots of *D. carota* subsp. *sativus* were chosen to determine preventive and protective effects in strawberry fruit against infection caused by *B. cinerea*. Unlike *in vitro* activity, the *in vivo* activity showed that disease severity caused by *B. cinerea* was significantly ( $P \leq 0.05$ ) reduced by root essential oil (Table 3). Essential oil used with the concentration of 0.01 mL/L air, showed a very interesting preventive (100%) and protective (80%) effect on strawberry up to seven days against the gray mould caused by *B. cinerea*, compared with the control, which were completely damaged from the 3rd day (Table 3). Hydrosol extract at concentration of 0.1 mL/L showed a preventive effect of 100% up to 5 day and 70% up to the 7th day. While, protective effect was of 100% up to 4th day and 60% up to the 7th day (Table 3).

### Consumer evaluation of strawberry fruit stored

Table 4 shows the acceptability scores of strawberry fruit samples. Results showed that there were a slight differences in the sensory properties (the taste and smell), since the scores of acceptability had a value of 4.0 for strawberry fruit treated by hydrosol extract and of 4.5 for control (without hydrosol extract). However, samples treated with essential oil, had a slightly bitter taste and its overall with acceptance scores were satisfactorily.

### Discussion and conclusion

Essential oils from plants and their major constituents, monoterpenes, sesquiterpenes and phenolic compounds might be an interesting source against fungal infections. They are relatively safe and environment benign (29,30). As regards our essential oil, the chemical composition of *D. carota* subsp. *sativus* exhibited a singular originality. Essential oils of aerial part and roots were clearly different from those of other origins. Indeed, alismol and geranyl linalool, have never have been found in other species of various origins. Many factors, as the geographical region, the species and age of the plant are responsible for the alteration on essential oils chemical components and change the types and amounts of major constituents. Thus,



**Table 1.** Chemical composition of essential oils and hydrosol extracts of *D. carota* subsp. *sativus*.

N°	Components <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	Essential oils		Hydrosol extracts		Identification <sup>f</sup>
					Roots <sup>e</sup>	Aerial parts <sup>e</sup>	Roots <sup>e</sup>	Aerial parts <sup>e</sup>	
1	Heptane	700	695	701	–	0.3	–	–	RI, MS
2	Hexanal	770	771	1048	–	–	0.3	0.2	RI, MS
3	Octane	800	796	802	–	–	0.1	–	RI, MS
4	(E)-2-Hexenal	832	830	1202	–	–	1.8	0.8	RI, MS
5	Heptanal	876	875	1185	0.1	0.2	0.3	0.2	RI, MS
6	Benzaldehyde	929	928	1525	–	–	0.9	0.9	RI, MS
7	$\alpha$ -Thujene	932	925	1011	0.5	0.2	–	–	RI, MS
8	$\alpha$ -Pinene	936	930	1015	–	0.2	–	–	RI, MS
9	Octen-3-one	956	956	1289	0.2	–	0.1	0.2	RI, MS
10	6-Methyl-hept-5-en-2-one	966	960	1326	0.1	0.1	0.3	0.3	RI, MS
11	Sabinene	973	965	1113	0.1	0.1	–	–	RI, MS
12	$\beta$ -Pinene	978	970	1103	–	0.1	–	–	RI, MS
13	Octanal	980	977	1290	–	–	0.5	6.2	RI, MS
14	2-Pentylfuran	981	977	1350	–	0.1	tr	–	RI, MS, Ref
15	Myrcene	987	982	1152	1.8	2.1	–	–	RI, MS
16	Phenylacetaldehyde	1013	1009	1616	–	–	2.1	3.6	RI, MS
17	$\alpha$ -Terpinene	1013	1009	1267	0.7	0.2	–	–	RI, MS
18	p-Cymene	1015	1011	1254	0.7	1.2	–	–	RI, MS
19	Limonene	1025	1021	1194	–	0.6	–	–	RI, MS
20	(E)- $\beta$ -Ocimene	1034	1036	1238	–	0.4	–	–	RI, MS
21	Acetophenone	1044	1036	1605	–	–	0.3	–	RI, MS
22	$\alpha$ -Terpinene	1051	1048	1233	0.8	–	–	–	RI, MS
23	(E)-Linalool oxide THF	1058	1052	1430	–	tr	0.1	0.2	RI, MS
24	(Z)-Linalool oxide THF	1073	1070	1440	–	–	0.2	0.6	RI, MS
25	Nonan-2-one	1074	1069	1385	0.1	–	0.1	0.5	RI, MS
26	Terpinolene	1082	1076	1275	0.6	0.3	–	–	RI, MS
27	Nonanal	1076	1081	1386	3.8	–	0.3	0.5	RI, MS
28	Linalool	1086	1083	1540	–	–	2.1	1.8	RI, MS
29	Perillene	1090	1086	1455	0.1	–	–	–	RI, MS Ref
30	(E)-2-Nonenal	1136	1134	1520	0.1	2.1	0.9	0.6	RI, MS
31	4-methyl-Acetophenone	1155	1154	1747	–	–	0.5	5.6	RI, MS
32	p-Cymen-8-ol	1161	1161	1830	–	–	1.2	8.9	RI, MS
33	Terpinen-4-ol	1164	1166	1598	2.8	0.3	2.1	1.2	RI, MS
34	$\alpha$ -Terpineol	1176	1173	1699	–	0.1	0.8	–	RI, MS
35	Decanal	1180	1183	1491	–	–	0.1	–	RI, MS
36	$\beta$ -Cyclocitral	1195	1196	1610	–	–	0.3	–	RI, MS Ref
37	Thymyl methyl oxide	1215	1214	1585	–	–	–	0.2	RI, MS
38	trans-Chrysanthenyl acetate	1222	1219	1520	–	–	1.3	0.6	RI, MS
39	(E)-2-Decenal	1240	1237	1645	0.4	tr	0.1	–	RI, MS
40	Bornyl acetate	1270	1268	1570	3.1	0.4	0.8	1.1	RI, MS
41	2-Undecanone	1273	1272	1590	0.1	0.4	–	1.3	RI, MS
42	Carvacrol	1278	1282	2219	–	–	0.5	0.4	RI, MS
43	(E,E)-2,2-Decadienal	1291	1288	1816	2.1	tr	–	–	RI, MS
44	Theaspirane I	1299	1298	2476	0.4	tr	–	–	RI, MS
45	Tridecane	1300	1304	1302	0.2	tr	–	–	RI, MS
46	Theaspirane II	1313	1317	1514	0.4	tr	–	–	RI, MS
47	Eugenol	1330	1327	2171	–	–	7.9	0.8	RI, MS
48	$\delta$ -Elemene	1340	1333	1465	0.1	3.5	–	–	RI, MS Ref
49	$\alpha$ -Longipinene	1360	1359	1473	–	0.1	–	–	RI, MS
50	(E)- $\beta$ -Damascenone	1363	1361	1779	–	0.5	0.3	0.2	RI, MS
51	Methyl eugenol	1369	1373	2004	–	1.3	11.9	0.7	RI, MS
52	$\alpha$ -Copaene	1379	1377	1513	–	0.2	–	–	RI, MS
53	$\beta$ -Bourbonene	1386	1381	1497	–	0.4	–	–	RI, MS
54	$\beta$ -Elemene	1389	1386	1551	–	0.4	–	–	RI, MS
55	Isocaryophyllene	1409	1402	1568	0.5	–	–	–	RI, MS
56	$\gamma$ -Decalactone	1420	1430	1586	–	–	7.8	6.8	RI, MS
57	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	1421	1418	1582	0.9	5.5	–	–	RI, MS
58	Geranyl acetone	1430	1428	1849	0.1	1.3	–	5.6	RI, MS
59	$\alpha$ -Humulene	1455	1450	1664	0.4	9.5	–	–	RI, MS
60	(E)-Methyl-iso-eugenol	1463	1461	2175	0.9	2.8	16.6	3.1	RI, MS
61	$\beta$ -Ionone	1468	1464	1933	0.2	8.2	–	0.4	RI, MS
62	Germacrene D	1479	1476	1681	0.7	1.2	–	–	RI, MS
63	Myristicine	1489	1489	2185	2.1	1.0	17.8	0.5	RI, MS
64	(E,E)- $\alpha$ -Farnesene	1498	1495	1741	2.0	0.1	–	–	RI, MS
65	(E)- $\beta$ -Bisabolene	1503	1499	1716	0.4	0.4	–	–	RI, MS
66	$\delta$ -Cadinene	1515	1515	1748	0.3	0.2	–	–	RI, MS
67	(E)- $\gamma$ -Bisabolene	1521	1522	1749	2.1	0.2	–	–	RI, MS Ref
68	(E)- $\alpha$ -Bisabolene	1531	1532	1751	1.0	0.6	–	–	RI, MS
69	$\beta$ -Caryophyllene oxide	1546	1540	1897	–	0.3	–	–	RI, MS Ref
70	4-formyl-5-nor- $\beta$ -Caryophyllene	1564	1565	1991	0.3	0.4	–	1.5	RI, MS
71	Spathulenol	1572	1569	2112	1.2	4.9	–	0.2	RI, MS

(Continued)

**Table 1.** (Continued).

N°	Components <sup>a</sup>	IRIa <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	Essential oils		Hydrosol extracts		Identification <sup>f</sup>
					Roots <sup>e</sup>	Aerial parts <sup>e</sup>	Roots <sup>e</sup>	Aerial parts <sup>e</sup>	
72	Caryophyllene oxide	1578	1570	1937	0.1	4.1	–	9.8	RI, MS
73	Humulene epoxide II	1593	1592	2041	0.6	0.3	–	6.6	RI, MS
74	Ledol	1600	1601	2027	1.0	0.3	0.3	0.6	RI, MS
75	Zingiberenol 1	1599	1599	2109	–	–	–	0.3	RI, MS
76	Zingiberenol 2	1613	1612	2190	–	–	tr	4.7	RI, MS
77	Alismol	1619	1614	2240	1.0	15.2	3.1	3.2	RI, MS Ref
78	α-Cadinol	1643	1641	2229	0.9	0.2	2.1	2.6	RI, MS
79	(Z,Z)-Farnesal	1655	1651	2163	–	0.2	1.1	–	RI, MS
80	α-Bisabolol	1673	1668	2215	0.2	0.9	–	7.9	RI, MS
81	(Z,E)-Farnesol	1694	1692	2330	0.1	0.1	–	0.6	RI, MS
82	Heptadecane	1700	1699	1698	0.1	0.1	–	–	RI, MS
83	Phytone	1817	1828	2117	0.3	0.6	–	–	RI, MS Ref
84	Neophytadiene	1830	1836	2009	0.8	4.3	–	–	RI, MS Ref
85	(E,Z)-Farnesyl acetone	1871	1872	2335	0.5	0.1	–	0.3	RI, MS
86	Geranyl linalool	2010	2019	2537	50.3	0.3	–	5.6	RI, MS
87	Heicosane	2100	2098	2100	1.1	0.1	–	–	RI, MS
88	Octadecanoic acid	2113	2103	2605	0.5	3.3	6.3	–	RI, MS Ref
89	Dicosane	2200	2198	2197	0.3	0.1	–	–	RI, MS
90	Tricosane	2300	2298	2300	0.2	0.5	–	–	RI, MS
91	Tetracosane	2400	2397	2397	0.2	0.2	–	–	RI, MS
92	Pentacosane	2500	2498	2497	7.1	1.2	–	–	RI, MS
Total identification (%)					97.6	91.9	93.3	98.3	
Hydrocarbon compounds					23.6	38.8	–	–	
Monoterpene hydrocarbons					5.2	5.2	–	–	
Sesquiterpene hydrocarbons					8.4	22.3	–	–	
Diterpene hydrocarbons					0.8	5.3	–	–	
Non terpenic hydrocarbon compounds					9.2	6.0	–	–	
Oxygenated compounds					74.0	53.1	93.3	98.5	
Oxygenated monoterpenes					7.0	11.0	15.8	18.5	
Oxygenated sesquiterpenes					6.2	27.8	6.6	38.3	
Phenolic compounds					3.0	5.1	59.7	25.1	
Oxygenated diterpenes					50.3	0.3	–	5.6	
Non-terpenic oxygenated compounds					7.5	8.9	11.2	10.8	

<sup>a</sup>Order of elution is given on apolar column (Rtx-1).

<sup>b</sup>Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from König et al. (16).

<sup>c</sup>Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa).

<sup>d</sup>Retention indices on the polar Rtx-Wax column (Rip).

<sup>e</sup>Normalized % abundances were carried out using RFs relative to tridecane used as internal standard. They are given on the apolar column except for components with identical RIa (normalized % abundance are given on the polar column). tr, trace (<0.05%).

<sup>f</sup>Identification mode; RI, retention indices; MS, mass spectrometry in electron impact mode, Ref, compounds identified from literature data (16).

**Table 2.** Antifungal activity of essential oils and hydrosol extract against *P. expansum*, *A. niger* and *B. cinerea*.

Tested microorganisms	Percentage of inhibition (%)					
	Hydrosol extracts		Essential oils			
	Roots	Aerial parts	Roots	Aerial parts	Roots	Aerial parts
	0.1 mL/L	0.14 mL/L	30 mL/L	100 mL/L	70 mL/L	400 mL/L
<i>P. expansum</i>	88.9 ± 2.6	00 ± 00	31.1 ± 3.1	00 ± 00	100 ± 00	00 ± 00
<i>A. niger</i>	33.3 ± 3.2	00 ± 00	6.6 ± 1.1	00 ± 00	21.1 ± 1.9	00 ± 00
<i>B. cinerea</i>	86.5 ± 1.5	00 ± 00	66.3 ± 4.2	00 ± 00	100 ± 00	00 ± 00

the same species/variety is able to produce essential oils with different compositions (31). The observed differences in the chemical composition of essential oil of *D. carota* subsp. *sativus* from Algeria may be due to genetic structures, ecological situations or agricultural factors that influenced the plant.

High qualitative and quantitative variations of the essential oil chemical composition of *D. carota* species were revealed. The most common components are myrcene, α-pinene and sabinene but their amounts vary depending on species and plant organ, and additionally

on the developmental stage (32–34). Another important fraction of these species and subspecies may be phenylpropanoids such as (E)-methyl-isoeugenol (35), isochavicol (36,37), myristicine, dillapiole, apiole and elemicine (38–40). The major constituents of *D. carota* subsp. *sativus* of oils from Poland, Iran and Sweden were α-pinene, sabinene, (E)-β-caryophyllene, trans-anethole, carotol, myrcene, (E)-β-ocimene and methyl isoeugenol.

For the hydrosol extracts, the significant differences were observed in chemical composition. Phenolic compounds and oxygenated terpenes were the main fractions

**Table 3.** Effect of essential oil and hydrosol extract of roots of *D. carota* subsp. *sativus* on the preventive and protective of strawberry fruit against the infection caused by *B. cinerea*.

Days <sup>a</sup>	PDI <sup>c</sup> (%)					
	Negative control <sup>b</sup>	Positive control <sup>b</sup>	Essential oil (0.01 mL/L)		Hydrosol extract (0.1 mL/L)	
			Protective effect	Preventive effect	Protective effect	Preventive effect
1th	0 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2th	20 <sup>b</sup>	90 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
3th	80 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
4th	80 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
5th	90 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
6th	100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	30 <sup>bc</sup>	20 <sup>b</sup>
7th	100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	20 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	40 <sup>bc</sup>	30 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup>Days of storage.

<sup>b</sup>Negative control, strawberry fruits were sprayed sterile distilled water only and Positive control, strawberry fruits were only inoculated with *B. cinerea*.

<sup>c</sup>Percentage disease index (PDI). The means in a column followed by the same letter(s) represent values that are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 4.** Effect of root essential oil and hydrosol extract on acceptability sensory scores of strawberry fruit stored at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Treatment	Acceptability	Control
Hydrosol (0.1 mL/mL)	4.0	4.5
Essential oil (0.01 mL/mL)	3.8	

Notes: The results are expressed as the average of all grades. a 1 = strongly dislike, 2 = dislike, 3 = neither like nor dislike, 4 = like, 5 = strongly like.

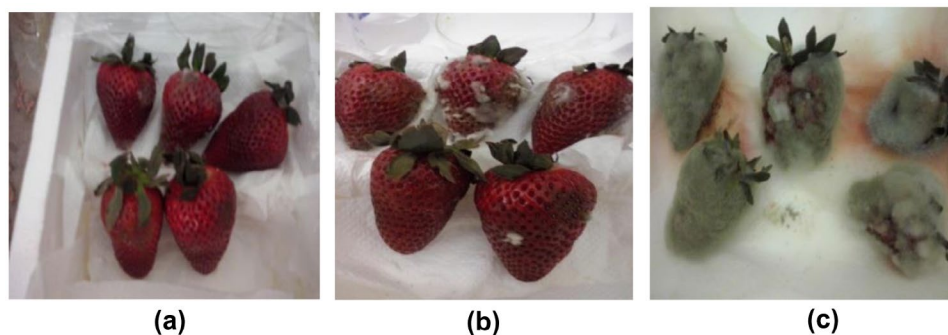
in hydrosol extracts. However, amounts of oxygenated diterpenes and oxygenated sesquiterpenes were higher in essential oils. Nevertheless, some compounds were reported only in hydrosol extract such as zingiberenol 1, zingiberenol 2, p-cymen-8-ol and 4-methyl-acetophenone. Finally, we note that several compounds reported in essential oils were either missing or present in low content in the hydrosol extracts; this may be due to the loss of many compounds in the hydrosol during hydrodistillation or due to their low solubility in water (41).

This study was conducted to assess the possibility of developing agents to control fungus diseases. The results of the present study suggest that essential oils and hydrosol extracts from roots of *D. carota* subsp. *sativus* have very interesting *in vitro* antifungal effects against the three pathogens. Only a few studies have been reported on antifungal activity of *D. carota* essential oils. Tavares et al. (42) demonstrated that *D. carota* subsp. *halophilus* oils showed effective antifungal activity against *dermatophyte* strains. The main compounds of these oils obtained from ripe umbels (seeds) were elemicin (26.0–31.0%) and sabinene (27.6–29.0%). *D. carota* subsp. *Gummifer* essential oil, which contained geranyl acetate (37.0%) and  $\alpha$ -pinene (30.9%) as the main components, exhibited considerable antifungal activities (43). Herb, flowering umbel and mature umbel oils from *D. carota* subsp. *carota* (collected in their natural habitat near Lodz Poland) were dominated by  $\alpha$ -pinene (17–42%) and sabinene (19–40%). They exhibited moderate antibacterial/antifungal activities against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* (34).

Our study indicated that root essential oil and hydrosol extract possess an *in vitro* antifungal activity against gray mould disease agent *B. cinerea*. The *in vivo* fungicidal activity of essential oils and hydrosol extracts of *D. carota* subsp. *sativus* was also investigated in post-harvest conditions. The strawberry fruits (preventive activity: no fungal inoculation and protective activity: after fungal inoculation) were exposed to essential oil or washed with hydrosol extract, in order to reveal whether essential oil and hydrosol extract have preventive or protective activities. Although essential oil and hydrosol extract were effective in reducing of disease severity in treatment preventive and protective during storage period at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , greatest activity was observed with essential oil that showed a 100% protection against gray mould with preventive treatment (Figure 1(a)). While, the treatment with hydrosol extract showed a preventive effect of 70% up 7 days of storage (Figure 1(b)). The results demonstrated the relative potential of root essential oil and hydrosol extract of *D. carota* subsp. *sativus* as natural antifungal for strawberry fruits that are susceptible to decay caused by *B. cinerea*.

The antifungal properties of our essential oil may be related to the presence of high concentrations of major compounds (Geranyl linalool, 50.3%) or to a synergistic effect with some active components. Geranyl linalool is a fragrance ingredient used in decorative cosmetics and fine fragrances (44). The activity of hydrosol extract of roots may be related to the presence of high concentrations of phenolic compounds such as myristicin (17.8%), (E)-methyl-isoeugenol (14.3%), methyl-eugenol (10.9%), eugenol (5.9%) and 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (5.3%). In general, the active antifungal compounds of essential oils are phenolic compounds (45,46).

Scores from consumer panel evaluation were used to assess the acceptability of treated strawberry fruits. However, the treatment of strawberry fruits with extracts was deemed acceptable by the panellists at the treatment levels. Further experiments are required to standardize



**Figure 1.** Preventive effect of root essential oil (a) and hydrosol extract (b) after seven days of storage at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , controls (c).

organoleptic characteristics and tested both extracts in storage.

In conclusion, we aimed as part of our programme to evaluate antifungal activity of plants extracts, in hopes to find new natural product(s) to be used as a bio-fungicide against plant pathogenic fungi. The results of *in vivo* tests show that the essential oil and hydrosol extract from roots of *D. carota* subsp. *sativus* are able to reduce growth of *B. cinerea* on solid media (*in vitro*) and to control infection of strawberry fruits by *B. cinerea* (*in vivo*) and could be exploited as a treatment for strawberry fruits disease.

### Acknowledgements

The authors are indebted to the Ministère des Affaires Etrangères et Européennes throughout the research program 'Partenariat Hubert Curien Tassili'.

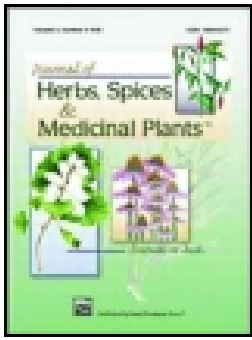
### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### References

1. K. Schnaubelt, *Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts*. International Journal of Aromatherapy, **15**, 98–105 (2005).
2. M. Mari, F. Neri and P. Bertolini, *Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruits*. Stewart Postharvest Review, **3**, 1–7 (2007).
3. J.L. Maas, *Compendium of Strawberry Diseases*, 2nd edn. APS Press, St. Paul, MN (1998).
4. P. Kumar, S. Mishra, A. Malik and S. Satya, *Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, Musca domestica (Diptera: Muscidae)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, **100**, 1–6 (2014).
5. J. Tian, X. Ban, H. Zeng, J. He, B. Huang and Y. Wang, *Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Cicuta virosa L. var. latisecta Celak*. International Journal of Food Microbiology, **145**, 464–470 (2011).
6. W. Feng, J. Chen, X. Zheng and L. Liu, *Thyme oil to control Alternaria alternata in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments*. Food Control, **22**, 78–81 (2011).
7. W. Feng and X.D. Zheng, *Essential oils to control Alternaria alternata in vitro and in vivo*. Food Control, **18**, 1126–1130 (2007).
8. M.D. Antunes and A.M. Cavaco, *The use of essential oils for postharvest decay control. A review*. Flavour and Fragrance Journal, **25**, 351–366 (2010).
9. E.M. Soylu, Ş. Kurt and S. Soylu, *In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, **143**, 183–189 (2010).
10. M.V. Bhaskara Reddy, P. Angers, A. Gosselin and J. Arul, *Characterization and use of essential oil from Thymus vulgaris against Botrytis cinerea and Rhizopus stolonifer in strawberry fruits*. Phytochemistry, **47**, 1515–1520 (1998).
11. A. Asghari-Marjanlo, Y. Mostofi, S.H. Shoeibi and M. Fattahi, *Effect of cumin essential oil on postharvest decay and some quality factors of strawberry*. Journal of Medicinal Plants, **8**, 25–43 (2009).
12. M. Zamani-Zadeha, S. Soleimani-Zadb, M. Sheikh-Zeinoddina and S.A. Amir-HosseinGoli, *Integration of Lactobacillus plantarum A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit*. Postharvest Biology and Technology, **92**, 149–156 (2014).
13. S. Mohammadi, A. Hossein, M.H. Aminifard and V. Jahanbakhsh, *In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against strawberry grey mould disease agent Botrytis cinerea*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, **45**, 2474–2484 (2012).
14. S. Kilani, I. Bouhlel and R. Ben Ammar, I. Ben SghairSkandrani, J. Boubaker, A. Mahmoud, M.G. Dijoux-Franca, K. Ghedira and L. Chekir-Ghedira, *Chemical investigation of different extracts and essential oil from the tubers of (Tunisian) Cyperusrotundus. Correlation with their antiradical and antimutagenic properties*. Annals of Microbiology, **57**, 657–664 (2007).
15. W. Jennings and T. Shibamoto, *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography*. In: Edit., H.B. Jovanovich, Academic Press, New York, NY (1980).
16. W.A. König, D.H. Hochmuth and D. Joulain, *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of Mass Finder 2.1*, 1st edn. Institute of Organic Chemistry, Hamburg (2001).
17. National Institute of Standards and Technology. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database. Gaithersburg, MD. <http://webbook.nist.gov/chemistry> (2008).

18. D.B. Mc Lafferty Stauffer, *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th edn. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Newfield, Palisade (1994).
19. F.W. Mc Lafferty and D.B. Stauffer, *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data*, 1st edn. Wiley-Interscience, New York, NY (1988).
20. National Institute of Standards and Technology. *NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. PC Version 1.7*. Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT (1999).
21. H.L. Barnett and B.B. Hunter, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th edn. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN (2006).
22. R.A. Samson, E.S. Hoekstra and J.C. Frisvad, *Introduction to Food and Airborne Fungi*, 7th edn. Centraal bureau voor Schimmel cultures, Utrecht (2004).
23. J. Wang, X.M. Xia, H.Y. Wang, P.P. Li and K.Y. Wang, *Inhibitory effect of lactoferrin against gray mould on tomato plants caused by Botrytis cinerea and possible mechanisms of action*. International Journal of Food Microbiology, **161**, 151–157 (2013).
24. P. Singh, B. Srivastava, A. Kumar, R. Kumar, N.K. Dubey and R. Gupta, *Assessment of Pelargonium graveolens oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation*. Journal of the Science of Food and Agriculture, **88**, 2421–2425 (2008).
25. D.K. Pandey, N.N. Tripathi and R.D. Tripathi, *Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of Hyptissuaveolens*. Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz, **89**, 344–349 (1982).
26. J. Tian, X. Zeng, A. Lü, A. Zhu, X. Peng and Y. Wang, *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 (2015).
27. Y. Li, *Department of Plant Pathology and Ecology*. The Connecticut Agricultural Experiment Station. <http://www.ct.gov/caes> (2013).
28. M. Soković, D. Stojković, J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Ristić and D. Grubišić, *Susceptibility of pathogenic bacteria and fungi to essential oils of wild Daucus carota*. Pharmaceutical Biology, **47**, 38–43 (2009).
29. S.G. Griffin, S.G. Wyllie, J.L. Markham and D.N. Leach, *The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity*. Flavour and Fragrance Journal, **14**, 322–332 (1999).
30. H.J.D. Dorman and S.G. Deans, *Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils*. Journal of Applied Microbiology, **88**, 308–316 (2000).
31. I. Telci, I. Demirtas and A. Sahin, *Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (Foeniculum vulgare Mill.) fruits during stages of maturity*. Industrial Crops and Products, **30**, 126–130 (2009).
32. P.G. Rossi, L. Bao, A. Luciani, J. Panighi, J.M. Desjobert, J. Costa, J. Casanova, J.M. Bolla and L. Berti, *(E)-Methyl isoeugenol and elemicin: Antibacterial components of Daucus carota L. essential oils against Campylobacter jejuni*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **55**, 7332–7336 (2007).
33. M. Staniszevska and J. Kula, *Composition of the essential oil from wild carrot umbels (Daucus carota L. ssp. carota) growing in Poland*. Journal of Essential Oil Research, **13**, 439–441 (2001).
34. J. Kula, K. Izydorczyk, A. Czajkowska and R. Bonikowski, *Chemical composition of carrot umbels oils from Daucus carota ssp. sativus cultivated in Poland*. Flavour and Fragrance Journal, **21**, 667–669 (2006).
35. P.G. Rossi, L. Bao, A. Luciani, J. Panighi, J.M. Desjobert, J. Costa, J. Casanova, J.M. Bolla and L. Berti, *(E)-Methylisoeugenol and elemicin: Antibacterial components of Daucus carota L. essential oils against Campylobacter jejuni*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **55**, 7332–7336 (2007).
36. M.A. Dib, N. Djabou, J.M. Desjobert, H. Allali, B. Tabti, A. Muselli and J. Costa, *Characterization of volatile compounds of Daucus crinitus Desf. Headspace solid phase microextraction as alternative technique to hydrodistillation*. Chemistry Central Journal, 4–16 (2010).
37. D.A. Lanfranchi, H. Laouer, M. El Kolli, S. Prado, C. Maulay-Bailly and N. Baldovini, *Bioactive phenylpropanoids from Daucus crinitus Desf. from algeria*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **58**, 2174–2179 (2010).
38. T. Smaili, A. Zellagui, P.L. Cioni and G. Flamini, *A myristicin-rich essential oil from Daucus sahariensis growing in Algeria*. Natural Product Communications, **6**, 883–886 (2011).
39. N. Radulović, N. Đorđević and Z. Stojanović-Radić, *Volatiles of the Balkan endemic Daucus guttatu sssp. Zahariadii and cultivated and wild-growing D. carota – A comparison study*. Food Chemistry, **125**, 35–43 (2010).
40. H. Marzouki, A. Khaldi, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, P. Mollicotti and S. Zanetti, *Essential oils of Daucus carota subsp. carota of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction*. Natural Product Communications, **5**, 1955–1958 (2010).
41. M. Zamani-Zadeha, S. Soleimani-Zadb, M. Sheikh-Zeinoddina and S.A. Amir-HosseinGoli, *Integration of Lactobacillus plantarum A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit*. Postharvest Biology and Technology, **92**, 149–156 (2014).
42. A.C. Tavares, M.J. Goncalves, C. Cavaleiro, M.T. Cruz, M.C. Lopes, J. Canhoto and L.R. Salgueiro, *Essential oil of Daucus carota subsp. halophilus. Composition, antifungal activity and cytotoxicity*. Journal of Ethnopharmacology, **119**, 129–134 (2008).
43. J. Valente, M. Zuzarte, R. Resende, M.J. Gonçalves, C. Cavaleiro, C. Pereira, M.T. Cruz and L. Salgueiro, *Daucus carota subsp. gummifer essential oil as a natural source of antifungal and anti-inflammatory drugs*. Industrial Crops and Products, **65**, 361–366 (2014). doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.014>.
44. A. Lapczynski, S.P. Bhatia, C.S. Letizia and A.M. Api, *Fragrance material review on geranyl linalool*. Food and Chemical Toxicology, **46**, S176–S178 (2008).
45. S.M. Al-Reza, A. Rahman and S.C. Kang, *Chemical composition and inhibitory effect of essential oil and organic extracts of Cestrum nocturnum L. on food-borne pathogens*. International Journal of Food Science & Technology, **44**, 1176–1182 (2009).
46. A. Cakir, S. Kordali, H. Zengin, S. Izumi and T. Hirata, *Composition and antifungal activity of essential oils isolated from Hypericumhyssopifolium and Hypericumheterophyllum*. Flavour and Fragrance Journal, **19**, 62–68 (2004).



## Chemical Variability Of Essential Oil of *Daucus carota* subsp. *sativus* from Algeria

Amina Tabet Zatla, Mohammed El Amine Dib, Nassim Djabou, Boufelfja Tabti, Nawel Meliani, Jean Costa & Alain Muselli

To cite this article: Amina Tabet Zatla, Mohammed El Amine Dib, Nassim Djabou, Boufelfja Tabti, Nawel Meliani, Jean Costa & Alain Muselli (2017): Chemical Variability Of Essential Oil of *Daucus carota* subsp. *sativus* from Algeria, *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, DOI: [10.1080/10496475.2017.1296053](https://doi.org/10.1080/10496475.2017.1296053)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10496475.2017.1296053>



Published online: 29 Mar 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

## Chemical Variability Of Essential Oil of *Daucus carota* subsp. *sativus* from Algeria

Amina Tabet Zatla<sup>a</sup>, Mohammed El Amine Dib<sup>b</sup>, Nassim Djabou<sup>a</sup>, Boufelfja Tabti<sup>b</sup>, Nawel Meliani<sup>b</sup>, Jean Costa<sup>c</sup>, and Alain Muselli<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Université de Tlemcen, Tlemcen, Algeria; <sup>b</sup>Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, Tlemcen, Algeria; <sup>c</sup>Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, Corte, France

### ABSTRACT

Chemical compositions of essential oils of *Daucus carota* subsp. *sativus*, from eight locations in Algeria, obtained by hydrodistillation, were identified by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectroscopy (GC/MS). The essential oils extracted from roots were composed mainly of oxygenated diterpenes (27.3%), oxygenated sesquiterpenes (14.3%), and nonterpenic hydrocarbon compounds (12.2%); oils extracted from aerial parts were characterized by sesquiterpene hydrocarbons (28.6%), oxygenated sesquiterpenes (24.0%), and monoterpene hydrocarbons (15.2%); compounds of roots' collective oil were geranyl linalool (27.3%), myristicine (7.3%), pentacosane (5.6%), spathulenol (3.8%), and (E)- $\gamma$ -bisabolene (3.2%). The major compounds of aerial parts' collective oil were: alismol (15.2%), (E)- $\beta$ -caryophyllene (10.1%), myrcene (9.6%),  $\alpha$ -humulene (9.5%), and  $\beta$ -ionone (5.2%).

### ARTICLE HISTORY

Received 15 September 2016

### KEYWORDS

Alismol; geranyl linalool

## Introduction

The use of plant extracts for medicinal purposes suggests the presence of pharmacologically active components in extracts and of certain essential oils (30). Carrots constitute a valuable source of health-promoting ingredients such as carotenes and are important in human nutrition (1). Carrots have been used traditionally in the treatment of ancylostomiasis, dropsy, chronic kidney disease, and bladder afflictions (25). Carrots are considered to be aromatic plants, which produce volatiles as constituents of essential oils extracted from roots, leaves, umbels, and seeds. The compositional variations in the essential oil of an aromatic plant depends on several factors such as genotype, climatic conditions, plant parts used, geographical locations, season of collection, stage of development, and processing of plant materials before essential oils extraction (2, 36). Thus, the same species/variety produces essential oils with different compositions (2).

**CONTACT** Mohammed El Amine Dib  a\_dibdz@yahoo.fr  Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algeria.

In most studies on carrots, monoterpene hydrocarbons dominate and make up 25–75% of all volatile components (2). The most common components are myrcene,  $\alpha$ -pinene, and sabinene, but their amounts vary depending on species and plant organ, and on developmental stage (13, 28, 33). Another important fraction of these species and subspecies may be phenylpropanoids such as (E)-methyl isoeugenol (28), isochavicol (5, 14), myristicine, dillapiole, apiole, and elemicine (16, 28, 31) (Table 1). They are usually followed by sesquiterpene hydrocarbons, while oxygenated terpenes are low. The major constituents of *D. carota* subsp. *sativus* of oils from Poland, Iran, and Sweden were  $\alpha$ -pinene, sabinene, (E)- $\beta$ -caryophyllene, *trans*-anethole, carotol, myrcene, (E)- $\beta$ -ocimene, and methyl isoeugenol (Table 1).

This study focused on the investigation of chemical compositions of essential oils obtained from aerial parts and roots of cultivated carrots harvested in eight locations from Western Algeria. Essential oils analysis was carried out using gas chromatography-retention indices (GC-RI) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The intraspecies variations of the essential oil compositions were discussed using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA).

## Materials and methods

### Plant material

Aerial parts and roots of *Daucus carota* subsp. *sativus* were collected in February–March 2014 from eight locations (S1–S8) (Table 2). The plant material was botanically identified and confirmed by the Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of the University of Tlemcen, Algeria. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen.

### Essential oils extraction

For roots and aerial parts of *D. carota* subsp. *sativus*, air-dried plant materials (1 kg) were hydrodistilled in a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia (4) for 5 h. The essential oil yields were expressed in percent (w/dw) through the weight of dried plant material (Table 2). The fresh plant material was dried for 5 d at room temperature; water content was close to 62.5% of plant weight.

### Essential oils fractionation

Collective oil of roots (1 g) and aerial parts (0.8 g) was obtained by the mixture of all oil samples, which was then subsequently submitted to flash



**Table 1.** Main components of *Daucus carota* essential oils from different origins previously reported in literature.

<i>D. carota</i> subsp.	Organs	Origins	Main components	References
<i>maritimus</i>	Flowers	Tunisia	Sabinene (51.6%), terpinen-4-ol (11.0%)	(9)
	Roots		Myristicine (29.7%), dillapiole (46.6%)	
<i>maximus</i>	Ripe/fruits	Egypt	Shyobunone (16.8–24.3%), $\beta$ -cubebene (3.5–12.7%), preisocalamendiol (17.9–32.7%)	(29)
<i>sativus</i>	Umbels	Poland,	$\alpha$ -Pinene (40.0–46.0%), sabinene (12.0–24.0%), (E)- $\beta$ -caryophyllene (4.6–13.2%)	(13)
	Leaves	Iran	<i>trans</i> -Anethole (23.5%), myrcene (14.5%)	(21)
	Seeds	Poland	Carotol (10.7–48.0%), $\alpha$ -pinene (9.0–18.0%)	(33)
	Fruits	Sweden	Myrcene (25.7–44.6%), (E)- $\beta$ -ocimene (8.0–11.3%), methyl isoeugenol (19.7–55.3%)	(11)
<i>gummifer</i>	Leaves	England	$\alpha$ -Pinene, $\gamma$ -terpinene, limonene, and myristicine	(37)
	Roots		$\beta$ -Pinene, humulene, and bornyl acetate	
<i>halophilus</i>	Fruits	Spain	Geranyl acetate (51.74–76.95%)	(26)
<i>halophilus</i>	Flowering umbels	Portugal	Sabinene (28.3–33.8%), limonene (11.0–11.8%)	(35)
	Ripe umbels		Elemicine (26.0–31.0%), sabinene (27.6–29.0%)	
<i>sativa</i>	Seeds	China	$\beta$ -bisabolene (80.49%), $\alpha$ -asarone (8.8%), and <i>cis</i> - $\alpha$ -bergamotene (5.51%)	(8)
	Stems and leaves	China	Caryophyllene (17.24%), myrcene (14.06%), (+)epi-bicyclo-sesquiphellandrene (10.14%), $\alpha$ -farnesene (17.1%), caryophyllene (10.9%), 1,2,4-methano-1H-cyclobuta [ $\beta$ ] cyclo (32.3%)	(39)
	Roots			
<i>carota</i>	Umbels	Italy	$\beta$ -Bisabolene (17.6–51.0%), carotol (2.4–25.1%), 11 $\alpha$ -(H)-himachal-4-en-1- $\beta$ -ol (9.0–21.6%), (E)-methylisoeugenol (1.3–10.0%)	(17)
	Umbels	Portugal	$\alpha$ -Pinene (13.0–37.9%), geranyl acetate (15.0–65.0%)	(16)
		Tunisia	Elemicine (31.5–35.3%), carotol (48.0–55.7%), 11- $\alpha$ -(H)-himachal-4-en-1- $\beta$ -ol (12.7–17.4%), sabinene (12.0–14.5%), $\alpha$ -selinene (7.4–8.6%)	
	All	Serbia	$\alpha$ -Pinene (7.1–51.2%), sabinene (2.7–36.7%), muurolene (8.2–10.9%)	(32)
	Fruits			
	Seeds	Turkey	Carotol (68.0%), daucene (8.7%)	(24)
	Aerial parts	Corsica	$\alpha$ -Pinene (15.9–24.9%), elemicine (11.4–16.3%), (E)-methyl-isoeugenol (21.8–33.0%)	(28)
	Herbs, umbels	Poland	$\alpha$ -Pinene (30.0–42.0 %), sabinene (19.5–40.5%), myrcene (2.5–7.0 %)	(13, 33)
	Seeds	Lithuania	Sabinene (28.2–37.5%), $\alpha$ -pinene (16.0–24.5%), terpinen-4-ol (4.6–7.5%), $\gamma$ -terpinene (2.9–6.0%)	(20)
	Roots	Vienna	$\alpha$ -Terpinolene (26–56%)	(3, 27)
Leaves		$\alpha$ -Pinene (20.9–44.8%), sabinene (14.2–19.5%)		
Fruits		$\alpha$ -Pinene (23.5–30.4%), sabinene (21.5–46.6%), geranyl-acetate (3.9–28.1%)		
Fruits	Serbia	Sabinene (18.7%), carotol (20.3%)	(6)	
Herbs, umbels	Poland	$\alpha$ -Pinene (16.1–42.7%), sabinene (21.3–45.3%), myrcene (4.0–12.9 %), limonene (3.55–6.75%)	(7)	

chromatography (FC, silica gel 200–500  $\mu$ m, elution with *n*-pentane, then with diethyl ether). Two fractions were obtained: fraction I apolar (0.29 g for roots and 0.45 for aerial parts hydrocarbon compounds) and fraction II polar (0.71 g for roots and 0.35 for aerial parts: oxygenated compounds).

**Table 2.** Data relative to the harvest locations of *Daucus carota* subsp. *sativus* from Algeria.

Samples	Location	GPS coordinates	Altitude (m)	Climate	Essential oil yield (%)	
					Roots	Aerial parts
S1	Aïn fezza	34°87'78"N; 1°23'36"O	846	Semiarid	0.033	0.002
S2	Ouchba	34°54'11"N; 1°12'47"O	775	Semiarid	0.106	0.006
S3	Tiaret I	35°22'15"N; 1°19'01"E	1031	Semiarid	0.084	0.008
S4	Tiaret II	35°22'76"N; 1°19'32"E	1011	Semiarid	0.012	0.003
S5	Oulhaça I	35°13'59"N; 1°30'16"O	248	Humid	0.223	0.122
S6	Oulhaça II	35°11'52"N; 1°06'11"O	222	Humid	0.280	0.184
S7	Rachgoun	35°19'20" N; 1°28'37" O	35	Humid	0.200	0.144
S8	Mostaganem	35°55'52" N; 0°05'21" E	102	Humid	0.298	0.139

### Gas chromatography

GC analyses were by Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and two fused-silica capillary columns (60 m × 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylenglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C.min<sup>-1</sup> and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in a split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 mL.min<sup>-1</sup>); injection volume was 0.2 μL. Retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software.

### Gas chromatography/mass spectrometry

Samples were analyzed with a Perkin-Elmer TurboMass quadrupole analyzer, coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with two identical fused-silica capillary columns and operated with the same GC conditions as described above, except for a split of 1/80. Electronic impact (EI) mass spectra were acquired under the following conditions: ion source temperature 150°C, energy ionization 70 eV, mass range 35–350 Da (scan time 1 s).

### Component identification and quantification

Identification of the components was based on: (i) the comparison of their GC retention indices (RI) on nonpolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of *n*-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data (10, 12, 22); and (ii) computer matching with commercial mass spectral libraries (18, 19, 23) and comparison of spectra with those of an in-house laboratory library. Component quantification was carried out using peak normalization percent

abundances calculated by integrating FID response factors relative to tridecane ( $0.7 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), used as internal standard.

## Results

### Essential oils yields

The results showed that essential oil yields vary with provenance, ranging from 0.012% to 0.298% (Table 2). The highest yield (0.298%) was observed from location S8 (a humid region at 33 m altitude), while the lowest (0.012%) was observed from location S4 (a semiarid region at 1,011 m altitude) which was 24 times lower than that of location S8. Based on the difference among essential oil yields, the 8 locations were classified into two orders.

- Order 1: Lower essential oil yields (locations S1–S4) to high-altitude regions and semiarid climates.
- Order 2: High essential oil yields (locations S1, S2, S5, S9, S10, and S11–S18) to low-altitude regions and humid climates.

### Chemical compositions of essential oils

The gas chromatographic profiles of the essential oils obtained from the roots and aerial parts of *D. carota* subsp. *sativus* contained a wide variety of compounds in low proportions; consequently, all individual oil samples were pooled to produce a “collective essential oil” (EO Coll.) that was used to perform detailed analysis using successive fractionations and GC/RI and GC/MS. Analysis of EO Coll of roots and aerial parts accounted for 92.7% and 95.2% of the total oil, and allowed the identification of 61 and 71 compounds, respectively (Table 3). All components were identified by comparison of their EI-MS and GC-RIs with those of our laboratory-produced Arômes library, with the exception of 10 components that were identified by comparison with spectral data and RIs from the literature (Table 3). Two essential oil types were produced by *D. carota* subsp. *Sativus*: The root EO Coll was dominated mainly by oxygenated compounds (64.8%), and those from the aerial parts by hydrocarbon compounds (50.4%) and oxygenated compounds (45.2%). The main components of were geranyl linalool, an oxygenated diterpene that exhibited in a surprisingly significant amount (27.3%), followed by myristicine (7.3%) and pentacosane (5.6%).

Conversely, the main components of aerial parts EO Coll were a mixture of hydrocarbon (50.4%) and oxygenated (64.8%) terpenes: Alismol (15.2%), (E)- $\beta$ -caryophyllene (10.1%), myrcene (9.6%),  $\alpha$ -humulene (9.5%),


**Table 3** Chemical variability of *Daucus carota* subsp. *sativus* essential oils from Algeria.

No.	Components <sup>a</sup>	<i>D. carota</i> subsp. <i>sativus</i> essential oils <sup>f</sup>																	EO Coll. Ap <sup>g</sup>	Identification <sup>h</sup>					
		Roots								Aerial parts															
		IRIa <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	R <sup>e</sup>	RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	AP51	AP52	AP53	AP54	AP55			AP56	AP57	AP58		
1	Heptane	700	695	701	1.1	1.2	1.1	3.3	1.7	0.1	0.3	0.3	—	tr	0.1	tr	0.1	—	—	—	—	0.3	—	RI, MS	
2	Hexanal	770	771	1048	—	—	—	0.3	—	—	—	—	—	0.2	—	0.2	—	—	—	—	—	—	—	RI, MS	
3	Octane	800	796	802	—	—	—	—	tr	0.1	—	—	—	0.1	tr	—	—	—	—	—	—	—	—	RI, MS	
4	(E)-2-Hexenal	832	830	1202	—	—	—	0.2	—	—	—	—	—	tr	—	tr	—	—	—	—	—	—	—	RI, MS	
5	Heptanal	876	875	1185	0.2	—	—	0.1	0.5	0.1	0.2	0.3	0.1	0.5	0.1	0.4	0.3	0.2	0.2	tr	0.2	0.2	0.2	RI, MS	
6	3-Nonene	895	892	930	2.1	2.5	2.3	5.5	2.8	—	—	—	—	0.1	—	tr	—	—	—	—	—	—	—	RI, MS	
7	Nonane	900	898	900	0.9	0.5	0.6	1.1	0.4	—	—	—	—	tr	—	tr	—	—	—	—	—	—	—	RI, MS	
8	$\alpha$ -Thujene	932	925	1011	0.1	—	—	—	—	0.3	0.3	0.4	0.5	0.1	0.3	0.1	—	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	RI, MS	
9	$\alpha$ -Pinene	936	930	1015	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.9	0.7	0.5	—	—	0.2	—	0.2	0.3	0.3	RI, MS	
10	Camphene	950	943	1060	—	—	—	—	—	—	—	—	—	tr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	RI, MS	
11	Octen-3-one	956	956	1289	—	—	—	—	—	tr	0.2	0.1	0.2	tr	—	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	RI, MS
12	6-Methyl-hept-5-en-2-one	966	960	1326	0.1	—	—	—	—	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	—	0.3	0.2	0.7	0.1	0.5	0.5	RI, MS	
13	Sabinene	973	965	1113	0.2	—	—	—	—	0.7	0.3	0.2	0.1	0.8	0.1	0.3	0.5	0.3	0.4	0.3	0.1	0.8	0.8	RI, MS	
14	$\beta$ -Pinene	978	970	1103	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.9	tr	0.6	—	—	0.2	0.1	0.1	0.3	0.3	RI, MS	
15	2-Pentylfuran	981	977	1350	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.6	tr	0.4	0.3	—	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	RI, MS Ref	
16	Myrcene	987	982	1152	2.5	2.8	3.2	3.1	7.9	1.7	1.2	1.7	1.8	13.1	13.3	10.1	10.2	3.2	3.4	3.8	2.1	9.6	9.6	RI, MS	
17	$\alpha$ -Terpinene	1013	1009	1267	0.5	0.1	tr	0.2	1.3	0.3	0.7	1.4	0.7	1.1	tr	0.1	0.2	0.5	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	RI, MS	
18	p-Cymene	1015	1011	1254	0.1	—	—	—	—	0.3	0.2	0.2	0.7	2.4	3.7	3.1	1.2	2.3	1.9	2.1	1.1	1.2	1.2	RI, MS	
19	Limonene	1025	1021	1194	—	—	—	—	—	tr	—	—	—	0.5	0.7	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.6	1.1	1.1	RI, MS	
20	$\beta$ -Phellandrene	1023	1021	1206	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	tr	0.8	0.2	0.1	tr	tr	tr	0.1	0.1	RI, MS	
21	(Z)- $\beta$ -Ocimene	1024	1025	1221	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	tr	0.1	tr	0.2	0.1	0.5	—	0.1	0.1	RI, MS	
22	(E)- $\beta$ -Ocimene	1034	1036	1238	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.4	1.4	1	0.9	0.4	0.5	0.8	0.4	0.6	0.6	RI, MS	
23	$\alpha$ -Terpinene	1051	1048	1233	0.3	0.2	0.5	0.1	0.3	0.8	0.2	0.1	0.8	0.5	tr	0.2	0.2	—	tr	—	—	—	—	RI, MS	
24	(E)-Linalool oxide THF	1058	1052	1430	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	tr	0.1	—	—	—	—	—	—	RI, MS	
25	Nonan-2-one	1074	1069	1385	0.4	0.3	0.1	0.2	0.4	0.9	0.3	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.3	0.3	tr	0.1	—	0.2	0.2	RI, MS	

(Continued)

Table 3 (Continued).

No.		Components <sup>a</sup>		D. carota subsp. sativus essential oils <sup>f</sup>																EO Coll. Ap <sup>g</sup>		Identification <sup>h</sup>	
				Roots								Aerial parts											
				IRIa <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	R <sup>e</sup>	RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	AP51	AP52	AP53	AP54				
26	Terpinolene	1082	1076	1275	0.5	—	tr	0.1	0.9	0.3	0.3	0.7	0.6	tr	0.8	0.1	0.1	0.5	0.3	0.9	0.3	0.5	RI, MS
27	Nonanal	1076	1081	1386	1.2	1.4	3.3	1.1	1.6	2.5	1.4	0.6	3.8	0.4	tr	0.3	0.6	—	—	—	—	0.2	RI, MS
28	Linalool	1086	1083	1540	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1	—	0.9	1.3	—	—	—	—	0.6	RI, MS
29	Perillene	1090	1086	1455	1.2	—	—	—	—	3.6	1.1	1.3	0.1	0.5	—	0.4	0.5	—	—	—	—	0.2	RI, MS Ref
30	(E)-2-Nonenal	1136	1134	1520	0.9	1.7	2.9	0.5	1.2	0.3	0.5	0.2	0.1	1.5	1.7	1.4	2.1	3.9	3.3	1.2	2.1	1.8	RI, MS
31	Terpinen-4-ol	1164	1161	1598	1.2	1.7	2.5	1.1	8.6	1.1	0.8	1.1	2.8	0.7	0.6	0.2	0.4	0.3	0.1	tr	0.3	0.5	RI, MS
32	$\alpha$ -Terpineol	1176	1173	1699	0.3	—	0.1	0.5	0.4	—	—	—	—	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	0.3	RI, MS
33	Decanal	1180	1183	1491	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	—	—	—	0.1	tr	tr	0.2	—	—	—	—	—	RI, MS
34	$\beta$ -Cyclocitral	1195	1196	1610	—	0.3	0.2	0.1	0.1	tr	—	—	—	0.1	—	0.1	0.3	—	—	—	—	—	RI, MS Ref
35	Thymyl methyl oxide	1215	1214	1585	0.2	—	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	—	0.1	—	0.1	0.1	—	—	—	—	—	RI, MS
36	3-Decen-2-one	1219	1221	1600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	0.1	0.2	—	—	—	—	—	RI, MS
37	(E)-2-Decenal	1240	1237	1645	0.5	0.9	0.6	0.1	0.5	0.1	0.3	0.8	0.4	0.3	0.3	0.1	0.2	0.4	0.3	0.1	tr	0.2	RI, MS
38	Bornyl acetate	1270	1268	1570	3.8	3.4	6.1	5.2	7.1	4.8	2.5	3.0	3.1	0.6	0.6	0.4	0.3	0.5	0.4	0.7	0.4	0.5	RI, MS
39	2-Undecanone	1273	1272	1590	0.1	—	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	tr	0.1	0.1	0.3	0.2	0.5	—	0.1	0.4	0.4	0.3	RI, MS
40	(E)-2-Decadienal	1291	1288	1816	1.2	1.1	2.4	3.4	1.1	0.4	0.1	0.9	2.1	0.1	tr	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	tr	0.2	RI, MS
41	Theaspirane I	1299	1298	2476	0.5	0.1	0.4	0.6	0.5	0.2	0.1	0.1	0.3	0.2	tr	0.1	0.1	—	0.3	0.1	0.1	0.3	RI, MS
42	Tridecane	1300	1304	1302	0.5	tr	tr	0.2	0.5	0.1	0.1	0.1	0.2	tr	—	0.1	tr	—	—	—	—	0.1	RI, MS
43	Theaspirane II	1313	1317	1514	0.6	1.1	0.5	0.6	0.8	0.6	0.2	0.2	0.4	0.1	—	0.1	tr	—	—	—	—	—	RI, MS
44	$\delta$ -Elemene	1340	1333	1465	—	—	—	—	—	tr	0.3	0.1	0.1	0.7	0.4	0.6	0.7	3.8	4.2	6.6	3.5	3.1	RI, MS Ref
45	$\alpha$ -Longipinene	1360	1359	1473	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.2	0.3	—	—	—	0.1	0.1	RI, MS
46	(E)- $\beta$ -Damascenone	1363	1361	1779	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	0.4	0.2	tr	—	0.1	0.3	0.5	0.2	RI, MS
47	Methyleugenol	1369	1373	2004	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.3	0.9	0.6	0.7	1.1	1.5	2.1	1.3	1.1	RI, MS
48	$\alpha$ -Copaene	1379	1377	1513	—	—	—	—	—	—	—	—	—	tr	0.6	0.1	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	RI, MS
49	$\beta$ -Bourbonene	1386	1381	1497	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	0.3	0.4	0.4	0.1	0.2	0.1	0.4	0.4	RI, MS

(Continued)



Table 3 (Continued).

No.		Components <sup>a</sup>		<i>D. carota</i> subsp. <i>sativus</i> essential oils <sup>f</sup>															EO Coll.	Identification <sup>h</sup>									
				Roots							Aerial parts																		
				R <sup>e</sup>	Rip <sup>d</sup>	Ria <sup>c</sup>	R <sup>a</sup> b	IRIa <sup>b</sup>	RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	AP51	AP52			AP53	AP54	AP55	AP56	AP57	AP58	AP <sup>g</sup>		
50	β-Elemene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	RI, MS			
51	Isocaryophyllene	0.7	1402	1568	1409	1406	1848	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	RI, MS		
52	α-Ionone	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	RI, MS	
53	(E)-β-Caryophyllene	1.6	1421	1418	1582	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10.1	RI, MS	
54	Geranyl acetone	1.2	1430	1428	1849	1.2	4.9	0.9	0.8	0.9	0.4	0.5	0.2	0.1	0.3	0.7	0.2	0.5	3.4	2.2	1.6	1.3	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	RI, MS
55	α-Humulene	0.8	1455	1450	1664	0.8	0.9	0.5	0.3	0.2	0.6	0.3	0.1	0.4	3.4	5.1	4.2	5.6	9.8	13.4	8.6	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	9.5	RI, MS
56	(E)-Methylisoeugenol	1.5	1463	1461	2175	1.5	3.8	0.8	1.7	1.1	1.1	1.6	1.1	0.9	0.1	4.3	0.2	tr	0.6	2.2	3.6	2.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	RI, MS
57	β-Ionone	0.3	1468	1464	1933	0.3	—	0.1	tr	0.5	0.3	0.2	0.8	0.2	1.4	3.5	1.5	1.8	7.7	5.4	9.1	8.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	RI, MS
58	Germacrene D	0.6	1479	1476	1681	0.6	1.3	0.5	0.6	1.3	0.5	0.4	0.7	0.7	5.4	0.9	5.3	5.5	1.8	2.2	1.2	1.2	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	RI, MS
59	Myristicine	7.3	1489	1489	2185	7.3	12.3	18.3	4.5	3.3	4.3	1.3	1.6	2.1	2.0	1.1	2.7	1.6	1.9	1.7	1.3	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	RI, MS
60	(E)-α-Farnesene	0.6	1498	1495	1741	0.6	0.9	0.2	0.5	0.7	1.4	1.3	1.2	2	0.4	0.5	0.3	0.3	0.3	0.7	0.4	0.1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	RI, MS
61	(E)-β-Bisabolene	0.5	1503	1499	1716	0.5	0.6	0.6	0.5	0.9	0.5	0.7	0.7	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.6	0.5	0.1	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	RI, MS
62	δ-Cadinene	0.5	1515	1515	1748	0.5	0.4	0.2	0.5	0.6	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.7	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	RI, MS
63	(E)-γ-Bisabolene	3.2	1521	1522	1749	3.2	4.8	2.9	1.2	1.1	2.3	1.9	2.6	2.1	0.2	0.4	0.3	0.8	0.1	1.1	tr	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	RI, MS Ref
64	(E)-α-Bisabolene	2.1	1531	1532	1751	2.1	0.8	1.0	0.8	0.4	3.0	1.4	0.8	1.0	0.9	0.6	0.5	0.6	1	1.1	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	RI, MS
65	β-Caryophyllene oxide	0.5	1546	1540	1897	0.5	0.6	0.3	0.2	0.3	0.1	0.1	—	—	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	tr	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	RI, MS Ref
66	4-formyl-5-nor-β-Caryophyllene	0.3	1564	1565	1991	0.3	0.5	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2	tr	0.3	0.9	0.1	0.8	0.2	0.4	0.4	0.1	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	RI, MS
67	Spathulenol	3.8	1572	1569	2112	3.8	6.8	2	5.3	3.4	3.5	2.1	3.1	1.2	9.5	9.2	10.1	14.3	3.8	3.1	2.1	4.9	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	RI, MS
68	Caryophyllene oxide	0.2	1578	1570	1937	0.2	0.2	tr	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	3.1	3.1	1.5	1.3	4.5	3.6	3.2	4.1	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	RI, MS
69	Humulene epoxide II	1.4	1593	1592	2041	1.4	1.2	0.8	1.1	0.7	2.3	2.4	2.3	0.6	0.8	0.6	0.5	0.3	0.2	0.3	0.5	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	RI, MS
70	Ledol	1.2	1600	1601	2027	1.2	1.1	1.8	1.9	1.3	2.1	1.1	2.4	1.0	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS

(Continued)

**Table 3** (Continued).

		<i>D. carota</i> subsp. <i>sativus</i> essential oils <sup>f</sup>																				EO Coll.	Identification <sup>h</sup>	
		Roots										Aerial parts												
		IRIa <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	Rip <sup>d</sup>	R <sup>e</sup>	RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	APS1	APS2	APS3	APS4	APS5	APS6	APS7	APS8			AP <sup>g</sup>
No.	Components <sup>a</sup>	1619	1614	2240	1.8	3.2	2.2	2.8	3.1	1.9	1.5	1.6	1.0	14.2	12.3	13.9	13.6	11.9	18.3	19.6	15.9	15.2	15.2	RI, MS Ref
71	Allisamol	1643	1641	2229	0.8	1.7	0.9	1.1	0.4	0.8	0.7	2.5	0.9	0.2	0.1	0.3	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	RI, MS
72	$\alpha$ -Cadinol	1655	1651	2163	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	tr	0.3	0.2	0.2	RI, MS
73	(Z,Z)-Farnesol	1673	1668	2215	0.7	2.4	2.5	0.3	0.5	0.8	0.2	0.9	0.2	1.3	0.2	1.5	1.1	0.6	0.9	0.7	0.1	0.9	0.9	RI, MS
74	$\alpha$ -Bisabolol	1694	1692	2330	0.2	0.3	0.1	0.5	0.5	0.6	0.2	0.2	0.1	0.1	0.6	tr	tr	0.1	0.1	tr	0.1	0.1	0.1	RI, MS
75	(Z,E)-Farnesol	1700	1699	1698	0.1	—	—	—	—	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	RI, MS
76	Heptadecane	1817	1828	2117	1.3	2.6	2.2	2.1	1.6	0.5	0.5	0.9	0.3	1.5	0.8	1.6	0.6	0.8	0.5	0.8	0.6	0.6	0.6	RI, MS Ref
77	Phytone	1830	1836	2009	0.9	0.3	0.5	0.7	0.6	0.6	1.5	0.8	2.3	1.1	2.5	2.9	8.4	6.3	6.3	5.3	4.3	4.3	4.3	RI, MS Ref
78	Neophytadiene	1871	1872	2335	2.1	5.5	4.6	4.6	3.5	0.9	1.5	2.2	0.5	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	RI, MS
79	(E,Z)-Farnesyl acetone	2010	2019	2537	27.3	13.5	17.8	25.8	23.7	32.5	40.6	38.3	50.3	0.9	0.2	1.3	0.8	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	RI, MS
80	Geranyl linalool	2100	2098	2100	0.8	0.8	0.6	0.8	0.9	1.0	1.8	1.2	1.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.3	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	RI, MS
81	Heicosane	2113	2103	2605	0.4	—	—	—	—	0.2	0.7	0.6	0.5	3.6	2.5	4.4	5.6	5.4	5.2	5.3	6.1	3.3	3.3	RI, MS Ref
82	Octadecanoic acid	2200	2198	2197	0.3	0.8	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.1	RI, MS
83	Dicosane	2300	2298	2300	0.5	—	—	—	—	0.2	0.4	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.5	0.8	0.6	0.4	0.5	0.5	RI, MS
84	Tricosane	2400	2397	2397	0.3	—	—	—	—	0.1	0.3	0.8	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	0.6	0.9	0.5	0.3	0.2	0.2	RI, MS
85	Tetracosane	2500	2498	2497	5.6	1.2	1.1	2.3	1.4	6.3	12.8	9.8	7.1	0.3	2.5	0.4	0.5	1.6	1.9	2.6	4.4	1.2	1.2	RI, MS
86	Pentacosane																							
	<b>Total</b>					<b>92.7</b>	<b>96.3</b>	<b>92.6</b>	<b>92.3</b>	<b>94.1</b>	<b>92.1</b>	<b>90.7</b>	<b>95.4</b>	<b>97.6</b>	<b>95.7</b>	<b>93.4</b>	<b>91.9</b>	<b>95.9</b>	<b>93.7</b>	<b>96.2</b>	<b>96.5</b>	<b>91.9</b>	<b>95.2</b>	
	<b>% Hydrocarbon compounds</b>					<b>27.9</b>	<b>23.6</b>	<b>17.3</b>	<b>17.4</b>	<b>25.7</b>	<b>24.1</b>	<b>27</b>	<b>27.3</b>	<b>23.6</b>	<b>46.7</b>	<b>48.2</b>	<b>43.7</b>	<b>44.2</b>	<b>43.6</b>	<b>44</b>	<b>42.1</b>	<b>38.8</b>	<b>50.4</b>	
	% Monoterpene hydrocarbons	4.2	3.1	3.7	3.5	10.4	4.4	3.2	4.7	5.2	21.0	21.0	17.1	13.6	8.0	7.5	9.4	5.2	15.2					
	% Sesquiterpene hydrocarbons	10.6	13.2	6.9	7.1	6.7	10.9	7.0	7.6	8.4	22.3	22.9	23.1	26.5	23.9	26.1	22.1	22.3	28.6					

(Continued)

**Table 3** (Continued).

No.	Components <sup>a</sup>	<i>D. carota</i> subsp. <i>sativus</i> essential oils <sup>f</sup>															EO Coll.	AP <sup>g</sup>	Identification <sup>h</sup>					
		RiIa <sup>b</sup>					RiIa <sup>c</sup>					RiP <sup>d</sup>								Aerial parts				
		RS1	RS2	RS3	RS4	RS5	RS6	RS7	RS8	AP51	AP52	AP53	AP54	AP55	AP56	AP57				AP58				
	% Diterpene hydrocarbons	0.9	0.3	0.5	0.7	0.6	0.6	0.6	1.5	0.8	2.3	1.1	2.5	2.9	8.4	6.3	6.3	5.3	4.3					
	% Nonterpene hydrocarbon compounds	12.2	7.0	12.2	13.6	8.0	8.2	16.2	13.5	9.2	1.1	3.2	1.0	1.2	3.3	4.1	4.3	6.0	2.3					
	<b>% Oxygenated compounds</b>	<b>64.8</b>	<b>64.8</b>	<b>75.3</b>	<b>74.9</b>	<b>68.4</b>	<b>68</b>	<b>63.7</b>	<b>68.1</b>	<b>74</b>	<b>49.0</b>	<b>45.2</b>	<b>48.2</b>	<b>51.7</b>	<b>50.4</b>	<b>52.2</b>	<b>54.4</b>	<b>53.1</b>	<b>44.8</b>					
	% Oxygenated monoterpenes	9.3	11.5	10.6	9	19	11.1	5.6	6.8	7.0	6.4	5.9	4.8	6.1	12.1	8.9	12.0	11.0	10.2					
	% Oxygenated sesquiterpenes	14.3	26.1	17.8	20.3	15.7	13.9	10.7	16.5	6.2	32.2	27.6	30.8	32.3	23.2	28.1	27.3	27.8	24.0					
	% Phenylpropanoids	8.8	16.1	19.1	6.2	4.4	5.4	2.9	2.7	3.0	2.4	6.3	3.5	2.3	3.6	5.4	7.0	5.1	3.4					
	% Oxygenated diterpenes	27.3	13.5	17.8	25.8	23.7	32.5	40.6	38.3	50.3	0.9	0.2	1.3	0.8	0.5	0.3	0.2	0.3	0.3					
	% Nonterpene oxygenated compounds	5.1	5.5	6.2	6.1	5.6	5.1	3.9	3.8	7.5	7.1	5.2	7.8	10.2	11.0	9.5	7.9	8.9	6.9					

<sup>a</sup>Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). <sup>b</sup>Retention indices of literature on the apolar column (RIa) reported from König et al., 2001. <sup>c</sup>Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). <sup>d</sup>Retention indices on the polar Rtx-Wax column (Rip). <sup>e</sup>HE coll R: collective essential oil roots. <sup>f</sup>Algerian samples: S1, Ain fezza I; S2, Ouchba; S3, Tiaret I; S4, Tiaret II; S5, Oulhaça I; S6, Oulhaça II; S7, Rachgoun; S8, Mostaganem. Percentages (means of three analyses). <sup>g</sup>HE coll AP: collective essential oil aerial parts. <sup>h</sup>RI: Retention indices. MS: mass spectrometry in electronic impact mode. Ref: Compounds identified from literature data (König et al., 2001).



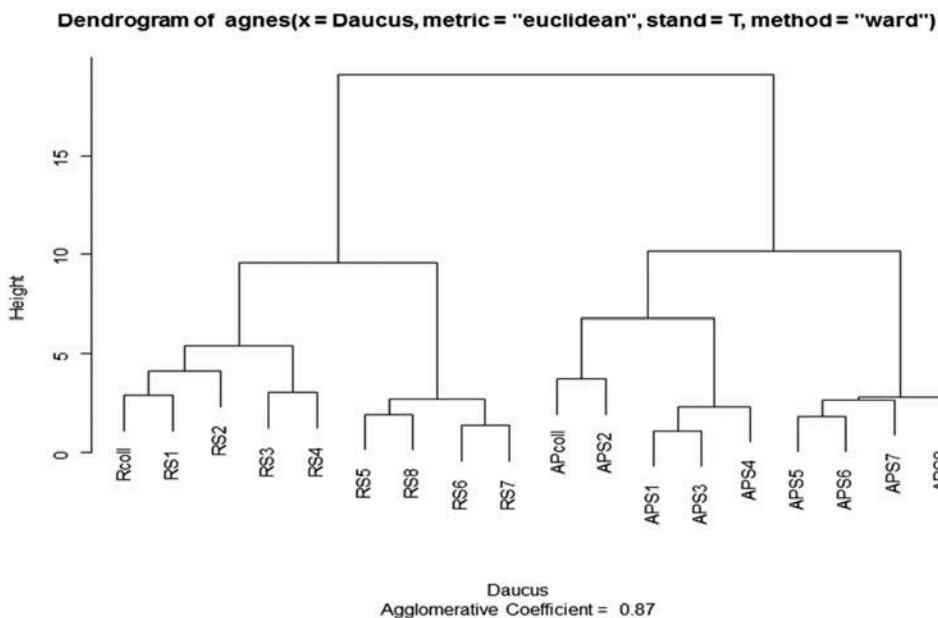
spathulenol (4.2%), and  $\delta$ -elemene (3.1%) were the major compounds. In contrast to previous studies on the chemical composition of *Daucus* species, the essential oils of *D. carota* subsp. *sativus* from Algeria differed greatly from the others by the presence of alismol and geranyl linalool (Table 3).

### **Chemical variability of *D. carota* subsp. *sativus* essential oils**

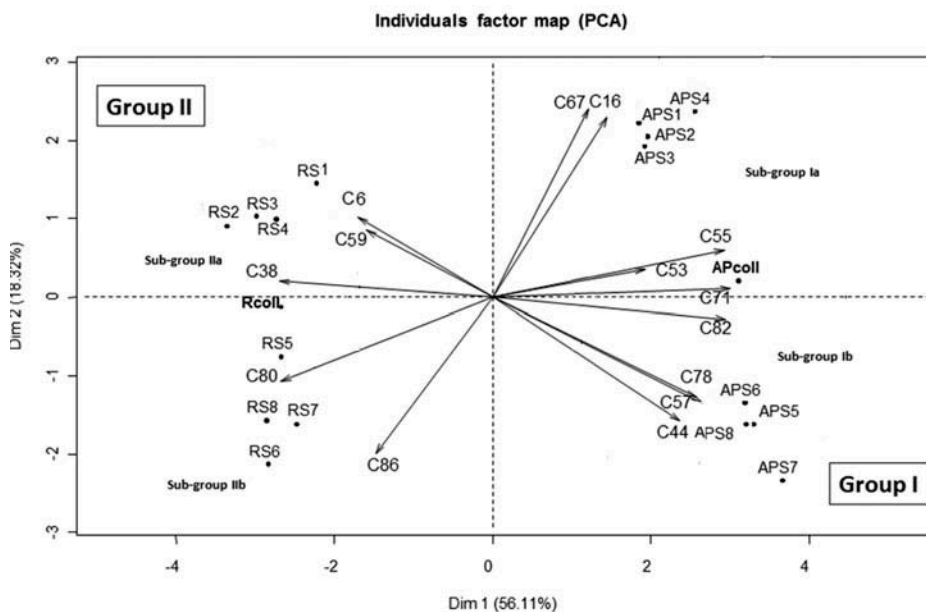
Although the eight essential oils from *D. carota* subsp. *sativus* aerial parts were qualitatively similar, there were differences in the normalized percentage abundances of their main components: myrcene (2.1–13.3%),  $\delta$ -elemene (0.4–6.6%), (E)- $\beta$ -caryophyllene (2.5–12.1%),  $\alpha$ -humulene (3.4–13.4%),  $\beta$ -ionone (1.4–9.1%), spathulenol (2.1–14.3%), alismol (11.9–19.6%), and neophytadiene (1.1–8.4%). For essential oils from roots, there are significant differences in the normalized percent abundances of their main components. For instance, geranyl linalool ranged from 13.5% to 50.3%, myristicine ranged from 1.3% to 18.3%, and pentacosane ranged from 1.1% to 12.8% (Table 3).

Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA; dendrograms) were applied to identify possible relationships between essential oil compositions and environmental factors, especially geographical origins of samples. The data presented in Fig. 1 and Fig. 2 were obtained from the correlation matrix and the standardized matrix linking essential oil compositions to sample locations. The dendrogram and plot established using the first two axes suggested that there are two main clusters of *D. carota* subsp. *sativus* oils (Fig. 1 and Fig. 2). One cluster included all sample oils from aerial parts and the other cluster included all sample oils from roots. Group I included eight aerial parts samples (APS1–8) and group II included eight roots oil samples from *D. carota* subsp. *sativus* (RS1–8). These results confirm that essential oils produced by roots were different than essential oils produced by aerial parts. Group I was subdivided to two subgroups. Subgroup Ia (APS1–4) originated from semiarid zones and was characterized by appreciable amounts of myrcene (10.1–13.3%), (E)- $\beta$ -caryophyllene (9.8–12.1%), spathulenol (9.2–14.3%), and alismol (12.3–14.2%). Subgroup Ib (APS4–8) originated from humid zones and was characterized by higher amounts of  $\beta$ -ionone (5.4–9.1%),  $\delta$ -elemene (3.5–6.6%), neophytadiene (5.3–8.4%), and alismol (11.9–19.6%).

The second group (II) (RS1–8) was divided into two subgroups according to the normalized percent abundances of geranyl linalool, myristicine, and pentacosane (Table 3). The first subgroup IIa (RS1–4, semiarid zones) was geranyl linalool (13.5–23.7%) and myristicine (3.3–18.3%) and the second subgroup IIb (RS5–8, humid zones) contained higher amounts of geranyl linalool (32.5–50.3%) and pentacosane (6.3–12.8%).



**Figure 1.** Cluster analysis (CA) of chemical compositions of *Daucus carota* subsp. *sativus* essential oils from Algeria (R, root; AP, aerial parts; S, sample).



**Figure 2.** Principal component analysis (PCA) of chemical compositions of *Daucus carota* subsp. *sativus* essential oils from Algeria (R, root; AP, aerial parts; S, sample; C, compounds of Table 3).

## Discussion

The yield and essential oil composition of aromatic plants is influenced by location of growing, developmental stage, harvest methods, postharvest drying, and ecological and climatic conditions (38). The statistical analysis clustered the essential oil roots into two distinct groups linked to the location of harvest. Specimens growing under semiarid climate and high altitude produced geranyl linalool/myristicin–dominant essential oils, while specimens growing under humid climate and low altitude produced greater amounts of geranyl linalool (up 50%) in the essential oil. By contrast, the essential oils of aerial parts from *D. carota* subsp. *sativus* were dominated by alismol whatever the climate type. The presence of geranyl linalool is important from a nutritional point of view, as it has inhibited cell proliferation in human cancer cell lines MCF-7, Ca Ski, and HCT-116 in a dose-dependent manner (34); the root essential oils obtained from the eight locations were rich in geranyl linalool, a fragrance ingredient used in decorative cosmetics and fine fragrances (15).

Cultivation of root *D. carota* subsp. *sativus* plants in sites with low altitude and with humid climate is useful to access the high essential oil yield and greater amount of geranyl linalool. The essential oils of aerial parts from *D. carota* subsp. *sativus* were not affected by the nature of the soils and climate and were dominated by alismol and spathulenol.

## Acknowledgment

The authors are indebted to Pr. Noury Benabadji for identification of plants and the Ministère des Affaires Etrangères et Européennes throughout the research program “Partenariat Hubert Curien Tassili.”

## References

1. Al-Safadi, B. 2008. Characterization and distribution of *Daucus* species in Syria. *Biologia* 63(2):177–182.
2. Cheng, S. S., M. T. Chua, E. H. Chang, C. G. Huang, W. J. Chen, and S. T. Cheng. 2009. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresour. Technol.* 100:465–470.
3. Chizzola, R. 2010. Composition of the essential oil from *Daucus carota* ssp. *carota* growing wild in Vienna. *J. Essent. Oil Res.* 13(1):12–19.
4. Council of Europe. 1997. *European Pharmacopoeia*. 1<sup>st</sup> ed. Council of Europe, Strasbourg.
5. Dib, M. A., N. Djabou, J. M. Desjobert, H. Allali, B. Tabti, et al. 2010. Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. headspace solid phase microextraction as alternative technique to hydrodistillation. *Chem. Cent. J.* 4:16.
6. Glisic, S. B., D. R. Mistic, M. D. I. T. Stamenic Zizovic, R. M. Asanin, and D. U. Skala. 2007. Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chem.* 105:3462–3470.

7. Gora, J., A. Lis, J. Kula, M. Staniszewska, and A. Wołoszyn. 2002. Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants. *Flavour Fragrance J.* 17:445–451.
8. Imamu, X., A. Yili, H. A. Aisa, V. V. Maksimov, O. N. Veshkurova, and Sh. I. Salikhov. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Daucus carota sativa* seeds. *Chem. Nat. Comp.* 43(4):495–496.
9. Jabrane, A., H. Ben Jannet, F. Harzallah-Skhiri, M. Mastouri, J. Casanova, and Z. Mighri. 2009. Flower and root oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated analyses by GC, GC/MS, and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, and *in vitro* antibacterial activity. *Chem. Biodivers.* 6:881–889.
10. Jennings, W., and T. Shibamoto. 1980. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. Academic Press, New York.
11. Kainulainen, P., J. Tarhanen, K. Tiilikkala, and J. K. Holopainen. 1998. Foliar and emission composition of essential oil in two carrot varieties. *J. Agric. Food. Chem.* 46:3780–3784.
12. König, W. A., D., H. Hochmuth, and D. Joulain. 2001. *Terpenoids and related constituents of essential oils*. (Library of Mass Finder 2.1 ed.). Institute of Organic Chemistry, Hamburg.
13. Kula, J., K. Izydorczyk, A. Czajkowska, and R. Bonikowski. 2006. Chemical composition of carrot umbels oils from *Daucus carota* ssp. *sativus* cultivated in Poland. *Flavour Fragr J.* 21:667–669.
14. Lanfranchi, D. A., H. LaouerH, M. El Kolli, S. Prado, C. Maulay-Bailly, and N. Baldovini. 2010. Bioactive phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J. Agric. Food. Chem.* 58:2174–2179.
15. Lapczynski, A., S. P. Bhatia, C. S. Letizia, and A. M. Api. 2008. Fragrance material review on geranyl linalool. *Food Chem. Toxicol.* 46:S176–S178.
16. Marzouki, H., A. Khaldi, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, et al. 2010. Essential oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia obtained by supercritical carbon dioxide extraction. *Nat. Prod. Commun.* 5:1955–1958.
17. Maxia, A., B. Marongiu, A. S. Piras, Porcedda, E. Tuveri, et al. 2009. Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia* 80:57–61.
18. McLafferty, F. W., and D. B. Stauffer. 1988. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data*, 4<sup>th</sup> ed. Wiley-Interscience, New York.
19. McLafferty, F. W., and D. B. Stauffer. 1994. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6<sup>th</sup>, ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Palisade, Newfield.
20. Mockute, D., and O. Nivinskiene. 2004. The sabinene chemotype of essential oil of seeds of *Daucus carota* L. ssp. *carota* growing wild in Lithuania. *J. Essent. Oil Res.* 16:277–281.
21. Mojab, F., A. Hamedi, B. Nickavar, and K. Javidnia. 2008. Hydrodistilled volatile constituents of the leaves of *Daucus carota* L. subsp. *sativus* (Hoffman.) Arcang. (Apiaceae) from Iran. *J. Essent. Oil Bear. Plants.* 11(3):271–277.
22. National Institute of Standards and Technology. 2008. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database. NIST, Gaithersburg, MD.
23. National Institute of Standards and Technology. 1999. NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT.

24. Özcan, M. M., and J. C. Chalchat. 2007. Chemical composition of carrot seeds (*Daucus carota* L.) cultivated in Turkey: Characterization of the seed oil and essential oil. *Grasas y aceites*. 58(4):359–365.
25. Pant, B., and S. Manandhar. 2007. *In-vitro* propagation of carrot (*Daucus carota*). *Sci. World J.* 5:51.
26. Pinilla, M. G., M. J. Pérez-Alonso, and A. Velasco-Negueruela. 1995. Volatile constituents from fruits of *Daucus carota* L. *gummifer* Hook. fil. *J. Essent. Oil Res.* 7:433–435.
27. Radulović, N., N. Đorđević, and Z. Stojanović-Radić. 2010. Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota*—A comparison study. *Food Chem.* 125:35–43.
28. Rossi, P. G., L. Bao, A. Luciani, J. Panighi, J. M. Desjobert, et al. 2007. (E)-Methylisoeugenol and elemicin: Antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oils against *Campylobacter jejuni*. *J. Agric. Food. Chem.* 55:7332–7336.
29. Saad, H. E. A., S. H. El Sharkawy, and A. F. Halim. 1995. Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*. *Pharm. Acta Helv.* 70:79–84.
30. Schnaubelt, K. 2005. Essential oil therapy according to traditional Chinese medical concepts. *Int. J. Aromather.* 15:98–105.
31. Smaili, T., A. Zellagui, P. L. Cioni, and G. Flamini. 2010. A myristicin-rich essential oil from *Daucus sahariensis* growing in Algeria. *Nat. Prod. Commun.* 6:883–886.
32. Soković, M., D. Stojković, J. Glamočlija, A. Ćirić, M. Ristić, and D. Grubišić. 2009. Susceptibility of pathogenic bacteria and fungi to essential oils of wild *Daucus carota*. *Pharm. Biol.* 47(1):38–43.
33. Staniszewska, M., and J. Kula. 2001. Composition of the essential oil from wild carrot umbels (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) growing in Poland. *J. Essent. Oil Res.* 13:439–441.
34. Syed Abdul Rahman, S. N., N. Abdul Wahab, and S. N. Abd Malek. 2013. *In vitro* morphological assessment of apoptosis induced by antiproliferative constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evid.-Based Complement. <i>Alternat. Med.* 20:257108.
35. Tavares, A. C., M. J. Goncalves, C. Cavaleiro, M. T. Cruz, M. C. Lopes, et al. 2008. Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*. Composition, antifungal activity and cytotoxicity. *J. Ethnopharmacol.* 119:129–134.
36. Telci, I., I. Demirtas, and A. Sahin. 2009. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*F. vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind. Crops Prod.* 30:126–130.
37. Ulrich, D., T. Nothnagel, and H. Schulz. 2015. Influence of cultivar and harvest year on the volatile profiles of leaves and roots of carrots (*Daucus carota* spp. *sativus* Hoffm.). *J. Agric. Food Chem.* DOI:10.1021/acs.jafc.5b00704.
38. Verma, R. S., R. K. Verma, R. C. Padalia, A. Chauhan, A. Singh, and H. P. Singh. 2011. Chemical diversity in the essential oil of Indian valerian (*Valeriana jatamansi* Jones). *Chem. Biodivers.* 8:1921–1929.
39. Wu Yin., Ze-Li. Xu Lih, Ong-Jun.Meng X, Iang-Ying. Bao, et al. 2006. Components of essential oils in different parts of *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm. *Chem. Res. Chin. Univ.* 22(3):328–334.

## ملخص:

إن الغاية من هذا البحث هي المساهمة في تطوير قطاع النباتات العطرية التي تستعمل كوسيلة لمقاومة بيولوجية ضد الأمراض المختلفة. وعليه تطرقنا في البحث إلى محورين أساسيين: المحور الأول كيميائي ويتضمن تحديد التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية ومستخلصات الحلالات المائية للنباتات الأربعة المدروسة: *Marrubium vulgare*، *Daucus carota ssp sativus*، *Cynoglossum cheirifolium*، *Ballota nigra*، *geranyl linalol* في زيت الجذور و *alisol* في زيت الأجزاء الهوائية، بينما *(E)-methyl-iso-eugenol* و *myristicine* هما المكونان الرئيسيان لمستخلص الحلالة المائية للجذور. بالإضافة إلى ذلك، كان أكسيد *caryophyllene* و *p-cymène-8-ol* المكونين الرئيسيين لمستخلص الحلالة المائية للأجزاء الهوائية. بنفس الطريقة، يمتلك *Marrubium vulgare* تركيبا كيميائيا أصيلا حيث يتميز بوجود ثلاثة مكونات رئيسية هي على التوالي: *E-β-caryophyllene*، *β-E-farnesene* و *α-humulene*. من جهة أخرى، المركبات الكيميائية الرئيسية التي تشكل الزيت الأساسي لـ *Ballota nigra* هي *β-bisabolene*، و أكسيد *caryophyllene* و *germacrene-D*. يتكون الزيت الأساسي لـ *C. cheirifolium* من المركبات الرئيسية التالية: *E-phytol*، *4-epi-cubebol* و *hexadécanoïque*. أما المحور الثاني فيولوجي وقد بينت فيه اختبارات النشاط المضاد للأكسدة أن كل المستخلصات المدروسة تقريبا تمتلك النشاطية ضد الأكسدة. علاوة على ذلك، قد لاحظنا بأن الزيوت الأساسية الأربعة تثبط نمو *P. expansum* و *A. alternata* المسببين للأمراض الفطرية للطمطمم بنسبة مهمة جدا لتثبيط تصل إلى 100%. كما أن سلالاتي *B. cinerea* و *P. expansum* المسؤولتين عن الأمراض الفطرية للفراولة قد كبحها تماما الزيت الأساسي لـ *D. carota ssp. sativus*. وقد أظهرت لنا أيضا اختبارات الزيوت الأساسية والحلالات المائية المجرات في الجسم الحي نشاطا مهما جدا في الحماية ضد العفن الأسود للطمطمم التي تسببها *A. Alternata* بمدة تخزين تصل إلى 15-20 يوما على التوالي بالنسبة إلى الشاهد وبالمثل، أظهر علاج الفراولة بزيت جذور *D. carota ssp. sativus* أفضل تأثير للوقاية والحماية خلال 7 أيام الأولى من التخزين. وأخيرا، أثبتت اختبارات الزيت الأساسي لـ *M. vulgare* على حشرة *T. absoluta* نشاطا جيدا لليرقات.

**كلمات البحث:** *D. carota ssp. sativus*، *Marrubium vulgare*، *Ballota nigra*، *Cynoglossum cheirifolium*، الزيوت الأساسية، الحلالات المائية، مضادات الأكسدة، القدرة المضادة للفطريات.

## Résumé:

L'objectif principal de ce travail de thèse est une contribution au développement de la filière des plantes aromatiques comme moyen de lutte biologique contre divers pathologies. Ainsi deux grands volets ont été développés: le premier est chimique, il consiste à la caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles et des extraits d'hydrolats de quatre plantes: *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra*, *Cynoglossum cheirifolium*. L'huile essentielle de *D. carota ssp. sativus* est caractérisée par la présence de deux composantes majeures: le géranyl linalol dans l'huile des racines et l'alisol dans l'huile des parties aériennes, alors que la myristicine, le (E)-méthyl-iso-eugénol sont les principaux composants de l'extrait d'hydrolat des racines. De plus, l'oxyde de caryophyllène et le p-cymène-8-ol ont été les principaux composés de l'extrait d'hydrolat des parties aériennes. De la même manière, l'huile essentielle de *M. vulgare* possède une composition chimique originale, caractérisée par la présence du E-β-caryophyllène, E-β-farnesène et l'α-humulène en tant qu'éléments majeurs. D'autre part les principaux composés chimiques qui constituent l'huile essentielle du *B. nigra*, sont le β-bisabolène, le caryophyllène oxyde, et le germacrène-D. L'huile essentielle de *C. cheirifolium* est constituée principalement par le E-phytol, l'acide hexadécanoïque, et le 4-epi-cubebol. Le deuxième volet (biologique) a montré que les tests de l'activité anti-oxydante ont montré, que presque tous les extraits étudiés possèdent une activité anti-oxydante. Par ailleurs, nous avons constaté que les quatre huiles essentielles inhibaient la croissance de *P. expansum* et de *A. alternata* responsable des maladies fongique des tomates avec des pourcentages d'inhibition très intéressants allant jusqu'à 100%. De même les souches de *B. cinerea* et *P. expansum* responsable des maladies fongiques de fraises ont été inhibé complètement par l'huile de *D. carota ssp. sativus*. Des tests *in vivo*, des huiles essentielles et des hydrolats ont montré également une très importante activité de protection contre la pourriture noire des tomates causée par *A. Alternata*, jusqu'à 15-20 jours de stockage respectivement, par rapport au témoin. De même, le traitement des fraises avec l'huile des racines de *D. carota ssp. sativus* et son extrait d'hydrolat ont présenté un meilleur effet préventif et protecteur pendant les 7 premiers jours de stockage. Enfin les tests de l'huile essentielle de *M. vulgare* sur l'insecte *T. absoluta* ont révélés une bonne activité larvicide.

**Mots clés:** *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra*, *Cynoglossum cheirifolium*, huiles essentielles, hydrolats, activité anti-oxydante, pouvoir antifongique.

## Abstract:

The main objective of this thesis is to contribute to the development of the aromatic plants as a means of biological control against various pathologies. Thus, two main parts have been developed: the main part is chemical: it consists in characterizing the chemical composition of essential oils and extracts of the hydrosols of the four plants: *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra*, *Cynoglossum cheirifolium*. The essential oil of *D. carota ssp. sativus* is characterized by the presence of two major components: geranyl linalool in root oil and alisol in aerial part oil, while, the myristicin, (E)-methyl-iso-eugenol were the main components of the root hydrosol extract. In addition, caryophyllene oxide and p-cymene-8-ol were the main components of aerial part hydrosol extract. In the same way, the essential oils and extracts of *M. vulgare* hydrosol have original chemical compositions, characterized respectively by the presence of E-β-caryophyllene, E-β-farnesene and α-humulene as major compounds. The main chemical compounds which constitute the essential oil of *B. nigra* are β-bisabolene, caryophyllene oxide, and germacrene-D. Essential oil of *C. cheirifolium* is consists principally by E-phytol, hexadecanoic acid, and 4-epi-cubebol. The second part (biological) showed that antioxidant activity tests showed that almost all the extracts studied possess antioxidant activity. Moreover, we found that the four essential oils inhibited the growth of *P. expansum* from *A. alternata* responsible for fungal diseases of tomatoes with very interesting inhibition percentages of up to 100%. Similarly, *B. cinerea* and *P. expansum* strains responsible for fungal diseases of strawberries were completely inhibited by the oil of *D. carota ssp. sativus*. *In vivo* tests of essential oils and hydrosols also showed a very important protection activity against tomato black rot caused by *A. Alternata*, up to 15-20 days of storage respectively, compared to the control. Similarly, the treatment of strawberry with roots oil of *D. carota ssp. sativus* and his hydrosol extract showed a better preventive and protective effect during the first 7 days of storage. Finally, the tests of *M. vulgare* essential oil on *T. absoluta* revealed a good larvicidal activity.

**Key words:** *Daucus. carota ssp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra*, *Cynoglossum cheirifolium*, essential oils, hydrosols, antioxidant activity, antifungal power.