



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN**

# THÈSE LMD

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**DOCTORAT**

Spécialité : **Chimie des Substances Naturelles**

Par :

**Mme LACHACHI Asma Née ALLAL**

Sur le thème

---

**Caractérisations chimiques, activités biologiques et valorisation d'extraits de plantes sous-utilisées de la région de l'ouest d'Algérie**

---

Soutenue publiquement le : //2021 à Tlemcen devant le jury composé de :

DIB Mohammed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen	Président
SELLES Chaouki	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
BENMEHDI Houcine	Professeur	Université de Bechar	Examineur
DJABOU Nassim	Professeur	Université de Tlemcen I.S.T.A	Examineur
TERKI HASSAINE Hafida	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice

*Laboratoire des substances Naturelles et bioactives (LASNABIO)*

*BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

## *Dédicaces*

*À mes chers parents, que Dieu les garde,*

*Je vous remercie d'être toujours là pour moi en témoignage de ma profonde affection, de m'avoir encouragée, soutenue d'avoir prié pour moi, je remercie Dieu de m'avoir donné l'honneur d'être votre fille. Que vous sachiez que ce travail est en partie le fruit de votre soutien.*

*Votre fierté à mon égard, aujourd'hui, est pour moi la meilleure des récompenses*

*À ma petite famille*

*Mes remerciements s'adressent également à mon mari Lotfi, pour son soutien, ses sacrifices et sa Patience durant ces années, et à mes deux garçons*

*À mes frères et à tous ceux et celles qui me sont chers*

# Remerciements

*Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage, la patience et la foi qu'il nous a donné pour mener à bien ce travail.*

*Cette thèse est l'aboutissement d'un travail réalisé sous la direction de Monsieur Pr. **Chaouki SELLES**. Je tiens à le remercier particulièrement pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la direction de ma thèse. Sa pleine disponibilité, son aide permanente, ses précieux conseils et ses connaissances scientifiques m'ont permis d'avancer très loin dans mes recherches. Je le remercie, également, pour ses grandes qualités humaines et son soutien moral tout au long de ces années. Cela a été un privilège pour moi, de travailler sous sa direction.*

*Mes travaux de recherche ont été effectués au :*

- i) Laboratoire des substances naturelles et Bioactives « LASNABIO ». Je tiens à remercier chaleureusement son directeur Pr. **Said GHALEM**, le chef d'équipe des huiles essentielles Pr. **Boufeldja TABTI** ainsi que tous les membres du laboratoire LASNABIO pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant la préparation de ma thèse, mais aussi durant mon cursus de master.*
- ii) Laboratoire « CRIOBE » de l'Université de Perpignan sous la direction du Pr. **Cedric BERTRAND** que je tiens à remercier pour m'avoir accueillie et assistée en me facilitant l'accès à tous les appareillages nécessaires et utiles. Mes remerciements vont à toute l'équipe et surtout Dr. **Vanessa ANDREU**, **Christian ESPINOSA** et **Hikmet GHOSSE** pour leur gentillesse et leur aide précieuse dans la réalisation des activités biologiques liées au biocontrôle, le test de l'écotoxicité ainsi que l'analyse de la variabilité chimique des huiles essentielles.*
- iii) Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement « LAMAABE ». Mes chaleureux remerciements sont dédiés à madame Pr. **Hafida TERKI HASSAINE** Directrice du laboratoire pour son aide, ses précieux conseils et d'avoir accepté de participer au jury pour examiner ce travail. Que Dr. **Samia BELLIFA** trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour la réalisation des tests des activités antimicrobiennes ainsi que pour ses encouragements et sa bonne humeur.*

*J'ai eu la chance d'effectuer l'analyse des huiles essentielles dans le laboratoire de « Chimie des Produits Naturels » de Corte, de l'Université de Corse (France) sous la direction de Messieurs les professeurs **Jean COSTA** et **Alain MUSELLI**. Qu'ils trouvent ici mes remerciements les plus distingués.*

*Je reste également redevable à Pr. **Noury BENABADJI** du Laboratoire d'Écologie et Gestion des Écosystèmes Naturels et surtout Dr. **Ali BABA** pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans l'identification botanique des deux espèces investiguées.*

*Ma profonde reconnaissance va également à Monsieur Dr. **Jalloul BOUAJILA**, du laboratoire de génie chimique-UMR de l'université de Toulouse pour m'avoir accueillie durant mon stage en France.*

*Qu'il me soit permis de remercier Pr. **Mohammed El Amine DIB** et Pr. **Nassim DJABOU** pour leurs conseils éclairés et l'aide qu'ils n'ont cessés de me prodiguer. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu apporter à ce travail en acceptant de participer à ce jury.*

*Que Monsieur Pr. **Houcine BENMEHDI** de l'université de Béchar, trouve ici l'expression de mes chaleureux remerciements pour l'importance qu'il a accordée à mon travail en acceptant d'être membre de ce jury et pour le temps consacré à l'examen de cette thèse.*

*Mes sincères remerciements s'adressent à **ma famille, ma belle famille**, mes proches et **mes ami(e)s et doctorants** qui m'ont soutenu(e) tout au long de mon parcours.*

*Je ne saurai oublier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.*

# SOMMAIRE

**Dédicaces**

**Remerciements**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

Introduction générale .....1

## CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Huiles essentielles .....	4
I.1. Introduction.....	4
I.2. Chimie des huiles essentielles .....	4
I.2.1. Variabilité phytochimique .....	5
I.3. Extraction des huiles essentielles et obtention des extraits d'hydrolats .....	6
I.4. Méthodes d'Analyses des huiles essentielles .....	7
I.4.1. Chromatographie en phase gazeuse CPG .....	7
I.4.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) .....	8
I.4.3. Acquisition et traitement des données .....	8
I.4.4. Outil statistique .....	9
I.5. Activités biologiques des huiles essentielles .....	10
II. Les Polyphénols.....	11
II.1. Introduction .....	11
II.2. Structure chimique et classification .....	11
II.3. Effets biologiques des polyphénols .....	12
II.4. Flavonoïdes .....	12
II.4.1. Structure chimique et classification .....	13
II.4.2. Localisation et distribution .....	13
II.4.3. Activités biologiques des flavonoïdes .....	14
II.5. Tanins .....	14
II.5.1. Classification.....	14
II.5.2. Localisation et distribution .....	15
II.5.3. Utilisation des tanins .....	15
III. Activités biologiques des plantes .....	15

III.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	15
III.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH .....	16
III.1.2. Test de réduction du fer FRAP.....	17
III.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne .....	17
III.2.1. La méthode de diffusion sur disque.....	17
III.2.2. La méthode de dilution en milieu liquide .....	18
III.3. Activité antifongique.....	18

## **CHAPITRE II : DESCRIPTION DES PLANTES ETUDIEES**

I. L'espèce <i>Daphne gnidium</i> L. (Thymeleaceae) .....	21
I.1. Famille des Thymeleaceae .....	21
I.1.1. Description botanique des Thymelaeaceae .....	21
I.2. Présentation de l'espèce <i>Daphne gnidium</i> .....	21
I.2.1. Description botanique .....	22
I.2.2. Classification systématique .....	23
I.2.3. Utilisation thérapeutique de <i>Daphne gnidium</i> L. ....	23
I.2.4. Toxicité de <i>Daphne gnidium</i> L. ....	23
I.2.5. Travaux scientifiques réalisés sur <i>Daphne gnidium</i> L. ....	24
II. L'espèce <i>Atractylis humilis</i> L. (Asteraceae) .....	27
II.1. Famille des Asteracées .....	27
II.1.1. Description botanique des Asteracées.....	28
II.1.2. Applications médicinales et intérêt, commercial, nutritionnel et pharmacologique des Astéracées .....	28
II.2. Présentation de l'espèce <i>Atractylis humilis</i> .....	29
II.2.1. Description botanique .....	30
II.2.2. Classification systématique .....	30
II.2.3. Usage thérapeutique et Toxicité .....	30
II.2.4. Travaux scientifiques réalisés sur <i>Atractylis humilis</i> .....	31

## **CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES**

I. Enquête ethnobotanique .....	33
II. Matériel végétal (Echantillonnage, Séchage et Conservation) .....	34
III. Extraction solide-liquide des plantes .....	35
III.1. Principe de l'extraction par soxhlet.....	35
III.2. Expérimentation.....	36
IV. Analyses phytochimiques.....	36

IV.1. Screening phytochimique .....	36
IV.2. Analyses quantitatives des extraits .....	38
IV.2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux .....	38
IV.2.2. Dosages des flavonoïdes .....	39
IV.2.3. Dosage des tanins .....	39
V. Caractérisation de la partie volatile des plantes .....	40
V.1. Principe de l'hydrodistillation .....	40
V.2. Protocole d'extraction .....	40
V.3. Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat .....	41
V.4. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles et d'extrait d'hydrolat....	42
V.4.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	42
V.4.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) .....	43
V.4.3. Outil statistique .....	43
VI. Extraction des acides gras et des insaponifiables .....	43
VII. Activités biologiques des plantes .....	44
VII.1. Evaluation de l'activité antioxydante .....	44
VII.1.1. Test de piégeage du radical libre (DPPH) .....	44
VII.1.2. Test de la réduction du fer : Méthode du FRAP .....	45
VII.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne .....	46
VII.2.1. Méthode de diffusion sur disque .....	46
VII.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	46
VII.3. Évaluation de l'activité antifongique .....	47
VII.3.1. Méthode de diffusion .....	47
VII.3.2. Méthode de fumigation.....	48
VIII. Test d'écotoxicologie sur des larves d'Artémis ( <i>Artemia salina</i> ) .....	48

#### **CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION**

I. Étude ethnobotanique .....	51
II. L'espèce <i>Daphne gnidium</i> L. ....	53
II.1. Rendements des extraits bruts .....	53
II.2. Criblage phytochimique .....	53
II.3. Dosage phytochimique des extraits .....	54
II.4. Caractérisation chimique de la partie volatile .....	54
II.4.1. Lieux de récolte et rendement .....	54

II.4.2. Composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de <i>D. gnidium</i> .....	55
II.5. Composition en acides gras de <i>D. gnidium</i> .....	59
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle, de l'extrait d'hydrolat et des différents extraits de <i>D. gnidium</i> L. ....	61
II.6.1. Test du piégeage du radical libre DPPH .....	61
II.6.2. Test de la réduction du fer (Méthode FRAP) .....	61
II.7. Évaluation de l'activité antibactérienne .....	62
II.7.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide .....	62
II.7.2. Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	64
II.8. Activité d'écotoxicologie sur les larves d'Artémis .....	65
III. L'espèce <i>Atractylis humilis</i> .....	66
III.1. Rendements des extraits bruts .....	66
III.2. Criblage phytochimique .....	67
III.3. Dosage phytochimique des extraits .....	68
III.4. Caractérisation chimique de la partie volatile .....	69
III.4.1. Lieux de récolte et rendements .....	69
III.4.2. Compositions chimiques des huiles essentielles de <i>Atractylis humilis</i> .....	70
III.4.3. Variabilité chimique inter-stations des huiles essentielles de <i>Atractylis humil</i> ...	75
III.5. Évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des différents extraits de <i>Atractylis humilis</i> .....	77
III.5.1. Test du piégeage du radical libre DPPH .....	77
III.5.2. Test de la réduction du fer : FRAP .....	79
III.6. Évaluation de l'activité antibactérienne .....	80
III.7. Évaluation de l'activité antifongique .....	85
Conclusion générale .....	88
Références bibliographiques.....	92

## **Annexes**

### **Publications et communications**

### **Résumé**



## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

<b>AA</b>	: Acide ascorbique
<b>ABS</b>	: Absorbance
<b>ACP</b>	: Analyse en Composante Principale
<b>C</b>	: Concentration
<b>CAH</b>	: Classification Ascendante Hiérarchique
<b>CC</b>	: Chromatographie liquide sur colonne ouverte
<b>CCM</b>	: Chromatographie sur couche mince
<b>CFA</b>	: Chromatographie flash automatisée
<b>CGP</b>	: Chromatographie en phase gazeuse préparative
<b>CLC</b>	: Chromatographie liquide sur colonne ouverte
<b>CLHP</b>	: Chromatographie liquide haute performance
<b>CLSI</b>	: Clinical & Laboratory Standards Institute
<b>CMB</b>	: Concentration minimale bactéricide
<b>CMI</b>	: Concentration minimale inhibitrice
<b>CPG</b>	: Chromatographie en phase gazeuse
<b>CPG/Ir</b>	: CPG/ Indice de rétention
<b>CPG/SM</b>	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>CPG/SM-IE</b>	: CPG/SM - Impact Electronique
<b>DPPH</b>	: 2, 2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle
<b>FID</b>	: Détecteur à ionisation de flamme
<b>FRAP</b>	: Ferric Reducing Antioxidant power
<b>GPS</b>	: Geometrical product specification
<b>HE</b>	: Huile essentielle
<b>HR-ESI-MS</b>	: High-Resolution ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry
<b>HY</b>	: Hydrolat
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Concentration inhibitrice à 50% des radicaux libres
<b>Ir</b>	: Indice de rétention
<b>M</b>	: Molarité
<b>m</b>	: Masse
<b>n</b>	: Nombre de moles
<b>N</b>	: Normalité
<b>OCDE</b>	: Organisation de coopération et de développement économiques

**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**RMN-<sup>13</sup>C** : Résonance magnétique nucléaire du carbone-13  
**RMN-<sup>1</sup>H** : Résonance magnétique nucléaire du proton  
**T** : Température  
**UE** : Union européenne  
**UV-visible** : Spectrométrie ultraviolet-visible  
**V** : Volume

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b>	: Structure de base des flavonoïdes .....	12
<b>Figure 02</b>	: Structure des tanins .....	14
<b>Figure 03</b>	: Espèce <i>Daphne gnidium</i> L. ....	22
<b>Figure 04</b>	: Structure de Tiglian .....	24
<b>Figure 05</b>	: Structure de Daphnane.....	24
<b>Figure 06</b>	: Structure des coumarines Daphnétine et Daphnine.....	25
<b>Figure 07</b>	: Structure de Yuankanin .....	26
<b>Figure 08</b>	: Espèce <i>Atractylis humilis</i> L.....	29
<b>Figure 09</b>	: Extracteurs de type soxhlet.....	35
<b>Figure 10</b>	: Montage de l'hydrodistillation de type Clevenger .....	40
<b>Figure 11</b>	: Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat.....	42
<b>Figure 12</b>	: Activité antifongique des huiles essentielles par la méthode de diffusion.....	48
<b>Figure 13</b>	: Ecllosion des larves d'Artémis.....	49
<b>Figure 14</b>	: Test d'écotoxicologie sur des larves d'Artémis.....	49
<b>Figure 15</b>	: Huile essentielle de <i>D. gnidium</i> L.....	55
<b>Figure 16</b>	: Structures chimiques des principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat de <i>D. gnidium</i> L. ....	59
<b>Figure 17</b>	: Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'espèce <i>D. gnidium</i> .....	62
<b>Figure 18</b>	: Exemples de zones d'inhibition les plus importantes des extraits de <i>D. gnidium</i> .....	63
<b>Figure 19</b>	: Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide de l'espèce <i>D. gnidium</i> .....	65
<b>Figure 20</b>	: Spécimens de <i>A. humilis</i> récoltés dans la wilaya de Tlemcen.....	70
<b>Figure 21</b>	: Structures chimiques des principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>A. humilis</i> . ....	74
<b>Figure 22</b>	: Structures chimiques des principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle de la partie racine de <i>A. humilis</i> . ....	74
<b>Figure 23</b>	: Classification hiérarchique ascendante (CHA) des huiles essentielles de <i>A. humilis</i> .....	76
<b>Figure 24</b>	: Analyse en composantes principales (ACP) de la composition chimique des huiles essentielles de <i>A. humilis</i> .....	76

<b>Figure 25</b>	: Comparaison des concentrations IC <sub>50</sub> des extraits de <i>A. humilis</i> . ....	79
<b>Figure 26</b>	: Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP de <i>A. humilis</i> .....	80
<b>Figure 27</b>	: Diamètres des zones d'inhibition des HE de <i>A. humilis</i> .....	84
<b>Figure 28</b>	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.	
<b>Figure 29</b>	: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.	
<b>Figure 30</b>	: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 01</b>	: Données géographiques des zones d'études de <i>Atractylis humilis</i> L.....	34
<b>Tableau 02</b>	: Masse et rendement des extraits de <i>Daphne gnidium</i> L.....	53
<b>Tableau 03</b>	: Résultat de la phytochimie qualitative de la partie aérienne de <i>Daphne gnidium</i> L. ....	53
<b>Tableau 04</b>	: Teneurs en composés phénoliques de la partie aérienne de <i>Daphne gnidium</i> L.....	54
<b>Tableau 05</b>	: Composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de <i>Daphne gnidium</i> L.....	56
<b>Tableau 06</b>	: Composition en acides gras de la partie aérienne de <i>Daphne gnidium</i> L.....	60
<b>Tableau 07</b>	: Concentrations IC <sub>50</sub> des extraits de <i>D. gnidium</i> par la méthode DPPH.....	61
<b>Tableau 08</b>	: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits de <i>D. gnidium</i> .....	63
<b>Tableau 09</b>	: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de <i>D. gnidium</i> .....	65
<b>Tableau 10</b>	: Taux de mortalité des larves d'Artémis sous l'effet des différents extraits de <i>Daphne gnidium</i> .....	66
<b>Tableau 11</b>	: Masse et rendement des extraits de <i>Atractylis humilis</i> .....	67
<b>Tableau 12</b>	: Résultat de la phytochimie qualitative de la partie aérienne de <i>Atractylis humilis</i> .....	67
<b>Tableau 13</b>	: Résultat de la phytochimie qualitative de la racine de <i>Atractylis humilis</i> .....	68
<b>Tableau 14</b>	: Teneurs en composés phénoliques de <i>Atractylis humilis</i> .....	69
<b>Tableau 15</b>	: Lieux de récoltes, répartition géographique et rendements en huiles essentielles des huit échantillons de <i>A. humilis</i> .....	70
<b>Tableau 16</b>	: Variabilité chimique des huiles essentielles de <i>Atractylis humilis</i> .....	72
<b>Tableau 17</b>	: Les concentrations IC <sub>50</sub> des extraits de <i>Atractylis humilis</i> par la méthode DPPH.....	77
<b>Tableau 18</b>	: Activité antioxydante des extraits de <i>Atractylis humilis</i> par la méthode DPPH à différentes concentrations.....	78
<b>Tableau 19</b>	: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de <i>A. humilis</i> .....	83
<b>Tableau 20</b>	: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de <i>A. humilis</i> .....	84
<b>Tableau 21</b>	: Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de <i>A. humilis</i> ...	85

# INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, la phytothérapie occupe une place prépondérante et connaît un nouvel engouement vu l'utilisation de plus en plus croissante des plantes médicinales. Les produits naturels, principalement ceux dérivés de plantes sont souvent non toxiques dont les effets secondaires sont moindres que les drogues synthétiques et sont accessibles à des prix abordables [1-2].

Depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires. Les substances naturelles dont les plantes constituent la source principale, représentent près de 60% des médicaments dont nous disposons. Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nés de la modification chimique de molécules [3].

Le stress oxydant qui est impliqué dans la dégradation des cellules, est responsable de très nombreuses pathologies notamment celles dues au vieillissement telles que l'athérosclérose, divers cancers, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson et bien d'autres... C'est pourquoi, de nombreuses études dans divers domaines tels que l'industrie agroalimentaire, le médical et la pharmaceutique sont toujours à la recherche de nouvelles molécules antioxydantes qui peuvent réduire les effets du stress oxydant en agissant comme un système de protection qui lutte contre l'action des radicaux libres. Cependant, l'utilisation des antioxydants de synthèse a été largement décriée ces dernières années à cause de leurs effets indésirables [4].

Par ailleurs, la résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue une véritable préoccupation. Ce phénomène qui ne cesse de s'aggraver, touche toutes les espèces bactériennes et est qualifié par l'OMS comme un problème de santé publique. En effet, dans quelques années, les maladies infectieuses résistantes aux agents antimicrobiens deviendront la première cause de mortalité parmi les autres [5].

La recherche de substances naturelles à activités antioxydantes et antibactérienne constitue un enjeu scientifique important. C'est dans ce cadre qu'une investigation de quelques extraits de plantes issues de la médecine traditionnelle algérienne a été entreprise. Les extraits de plantes offrent donc, un axe de recherche et de développement stratégique en constituant une source importante pour la découverte de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. Afin d'évaluer l'efficacité et la sécurité de ces extraits, de nombreuses études *in vitro* doivent être menées qui, bien que très utiles, ne sont pas suffisantes. L'étude *in vivo* par l'utilisation de modèles animaux est essentielle pour prouver scientifiquement l'efficacité et l'innocuité de ces produits naturels [6].

La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe inévitablement par l'extraction et l'analyse chimique. Les plantes médicinales contiennent une grande diversité de composés différents, parmi lesquels, certains peuvent exercer une activité biologique. De nombreux travaux ont démontré que l'huile essentielle et d'autres métabolites secondaires, présentent un potentiel important en tant qu'agents antibactériens, antifongiques, antioxydants etc...[7].

L'Algérie, de par son climat méditerranéen, dispose d'une biodiversité floristique importante, à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. Dans la région de Tlemcen, au nord-ouest algérien où les conditions de climat et de sol sont spécifiques, poussent quelques espèces qui restent sous-utilisées et parfois oubliées. Malgré l'utilisation traditionnelle de ces plantes par la population locale, leur élucidation chimique précise demeure toujours insuffisante.

Dans cette thèse, et afin de promouvoir une meilleure valorisation de cette biodiversité végétale, nous nous sommes intéressés à deux plantes appartenant à deux familles différentes, à savoir ; *Atractylis humilis* (Asteraceae) et *Daphne gnidium* (Thymelaeaceae) qui poussent à l'état spontané dans les monts et les environs de Tlemcen. Cette sélection s'est faite dans un but d'explorer ces deux espèces négligées et sous-utilisées et de déceler leurs éventuels potentiels.

En se basant sur une recherche bibliographique détaillée sur la phytochimie des deux plantes, *D. gnidium* n'a fait l'objet que de quelques études alors que *A. humilis* n'a jamais été décrite dans la littérature.

Dans cette étude, les objectifs majeurs envisagés sont :

- L'enquête ethnobotanique sur *D. gnidium* et *A. humilis*
- Le criblage phytochimique qualitatif suivi du dosage quantitatif des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins contenus dans différents extraits obtenus par des solvants de polarités différentes.
- L'extraction des volatils des deux plantes et leur caractérisation par les techniques de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).
- L'évaluation des activités biologiques : antioxydante, antimicrobienne et antifongique ainsi que la réalisation de tests d'écotoxicologie.

Le présent manuscrit s'articule autour de trois chapitres :

**La première partie** est consacrée à un recueil bibliographique sur les espèces sélectionnées, à la classification et l'intérêt des composés phénoliques et des huiles essentielles. Cette partie comporte aussi la description de la séquence analytique mise en œuvre ainsi que l'outil statistique et une présentation théorique concernant les techniques des tests biologiques.

**La deuxième partie** décrit l'aspect expérimentale développé dans cette thèse en précisant les modalités d'échantillonnage, la préparation du matériel végétal, la démarche expérimentale et les modes employés pour réaliser les extractions et la méthodologie d'analyse ainsi que l'évaluation des activités biologiques des divers extraits.

**La troisième partie** présente l'ensemble des résultats obtenus suivis d'une discussion et couronnés par une conclusion générale qui résumera l'ensemble des résultats issus de cette étude chimique et biologique des deux espèces et présentera les perspectives de recherche concernant les étapes à réaliser dans un avenir proche.



*Chapitre I*  
*Synthèse bibliographique*



## I. Huiles essentielles

### I.1. Introduction

Malgré son ancienneté, l'étude des huiles essentielles est toujours d'une brûlante actualité. Depuis des millénaires, l'homme se parfume et parfume son environnement en ayant recours à des huiles essentielles et apprécie leurs vertus apaisantes et analgésiques. Les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des huiles essentielles. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées et plus efficaces. L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables [8].

Les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. En effet, avec les progrès de la science analytique, de nouvelles propriétés pharmacologiques et de nouveaux principes actifs ont permis de faire des huiles essentielles des médicaments authentiques. De nombreux composés volatils constituent aujourd'hui des ingrédients courants dans les préparations pharmaceutiques [9].

Les huiles essentielles sont des mélanges concentrés et de compositions chimiques très complexes et éminemment variables. Néanmoins, leur qualité dépend de plusieurs facteurs. Entre autres, les conditions de culture, de récolte, de stockage, d'extraction, et surtout de leur composition chimique. Il est donc important de bien connaître la chimie des huiles essentielles pour mieux valoriser et contrôler leur qualité.

### I.2. Chimie des huiles essentielles

Les huiles essentielles et la fraction volatile émise par une plante aromatique constituent des mélanges complexes de volatils qui suscitent un intérêt permanent. La valorisation de ces mélanges passe nécessairement par une étape de caractérisation chimique. Pour cela, il apparaît que l'étape de préparation de l'échantillon est tout aussi fondamentale que celle de l'analyse proprement dite des constituants [10-13], pour plusieurs raisons :

- Ces mélanges volatils sont généralement des mélanges complexes constitués majoritairement de molécules terpéniques qui sont formées d'unités isopréniques (2-méthyl-1,3-butadiène :  $C_5H_8$ ), « mono- et/ou sesquiterpènes et plus rarement des diterpènes », mais aussi de composés non terpéniques (chaînes linéaires, dérivés phénylpropanoïques, etc.) [14]. L'identification de ces molécules nécessite donc des techniques analytiques efficaces et fiables [13].
- La complexité de ces mélanges vient également du fait qu'ils sont constitués de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines de composés présents à des concentrations parfois extrêmement faibles. Classiquement, la concentration

perceptible pour les molécules odorantes peut être inférieure au nanogramme par litre. En conséquence, les procédures analytiques doivent présenter des sensibilités extrêmement élevées [15-16].

- Certaines molécules odorantes présentent une instabilité chimique sous l'action de la lumière, de la température, en présence d'oxydants ou au cours d'une étape de transformation avant commercialisation. Ainsi, à pression atmosphérique le temps de vie d'un monoterpène soumis à une exposition lumineuse est estimé à moins de 5 min pour l' $\alpha$ -terpinène et à 3 h pour le  $\alpha$ - et le  $\beta$ -pinène [12]. Les procédures de préparation des échantillons doivent être adaptées à la nature des constituants de la matrice à étudier.

- Pour les composés volatils générés à partir de sources biologiques, telles que les plantes ou les animaux, des difficultés analytiques surgissent du fait de la nature dynamique de ces systèmes [17]. Le fait que la production et l'émission des composés volatils d'une plante soient affectées par des facteurs comme la lumière, la température, un stress hydrique, une activité enzymatique ou la présence de polluants, pose des difficultés dans l'analyse.

### I.2.1. Variabilité phytochimique

A l'intérieur d'une même espèce végétale, des variations chimiques qualitatives et quantitatives importantes pourraient être observées ce qui conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple : *Thymus* à thymol, géraniol, carvacrol et linalol) [18] et parmi les nombreux constituants d'une huile essentielle, l'un domine généralement : on l'appelle composé majoritaire.

En se basant sur les travaux effectués sur les huiles essentielles, leur composition chimique est très fluctuante. En effet, de nombreux travaux signalent l'impact des effets macroscopiques et microscopiques sur la composition chimique de l'huile essentielle. Cette dernière peut varier considérablement en fonction de plusieurs paramètres. Elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol, climat, etc.) et/ou technique (la nature de stockage, la procédure d'extraction de l'essence de la plante).

La proportion des différents constituants de l'huile essentielle d'une espèce donnée varie en fonction du site de récolte. La différence de composition constatée sur les huiles essentielles investiguées est vraisemblablement à mettre en rapport avec des facteurs abiotiques tels que le climat des régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol.

Au sein d'une même espèce, la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente, on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes [19].

### **I.3. Extraction des huiles essentielles et obtention des extraits d'hydrolats**

L'extraction des huiles essentielles est certainement l'étape la plus délicate et la plus importante. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal. De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ces substances. La possibilité de développement d'une technique d'extraction dépend de nos jours de ses avantages par rapport à ses concurrentes : efficacité d'extraction (qualité et quantité), durée, coûts d'installations, coûts de fonctionnement (coût d'énergie, impact environnemental, entretien, degré d'automatisation etc.). L'absence de solvant organique devient également un élément important du fait des exigences réglementaires de plus en plus contraignantes.

L'hydrodistillation est la méthode normalisée et la plus recommandée pour l'extraction d'une huile essentielle [20], ainsi que pour le contrôle de sa qualité [21]. Il s'agit d'une technique très facile à mettre en œuvre. Basée sur le changement d'état liquide-vapeur des espèces chimiques, l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. Elle consiste à immerger directement la matière première végétale à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces composés volatils et semi-volatils sont entraînés par la vapeur d'eau crée formant ainsi un mélange azéotropique. Ces vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par une simple différence de densité. L'huile essentielle étant souvent plus légère que l'eau, surnage au-dessus de l'hydrolat. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait. En effet, la chaleur peut causer des modifications chimiques et des dégradations des composants thermosensibles [22].

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. A l'échelle du laboratoire, le système utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la pharmacopée européenne est le « Clevenger » [23].

L'hydrodistillation permet d'obtenir deux produits de distillation : la partie insoluble dans l'eau de condensation est décantée et fournit l'huile essentielle tandis que la partie contenant les composés hydrosolubles constitue l'hydrolat ou encore l'eau florale. L'huile essentielle est dense en principes actifs (non hydrosolubles) et l'hydrolat est chargé de composés oxygénés aromatiques de l'huile essentielle mais aussi d'autres principes actifs hydrosolubles non présents dans l'huile essentielle qui lui confèrent des propriétés propres [24]. Ainsi, afin d'analyser la composition chimique des hydrolats par CPG-SM, il est nécessaire de procéder à une extraction liquide-liquide avec un solvant organique tel que l'éther diéthylique afin de transférer les constituants volatils de la phase aqueuse à la phase organique qui sera injectée dans le chromatographe après évaporation du solvant.

#### **I.4. Méthodes d'analyses des huiles essentielles**

Une connaissance parfaite de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité pour sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques qui sont dans certains cas complémentaires [25]. La technique incontournable pour individualiser les constituants d'un mélange reste la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Son couplage à un détecteur à ionisation de flamme (FID) permet la quantification des constituants et le calcul de leurs indices de retentions.

La CPG est souvent combinée avec une technique d'identification spectrale, généralement la Spectrométrie de Masse (SM) ou la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier. Une nouvelle voie d'analyse est le recours à la RMN du carbone-13 qui permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans individualisation et sans séparation préalable.

##### **I.4.1. Chromatographie en phase gazeuse CPG**

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence et de séparation dans l'analyse des huiles essentielles. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. Comme toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire [22]. Dans un chromatographe en phase gazeuse, la séparation des composés est réalisée de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. La CPG permet l'individualisation et la quantification des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) [26].

Bien que la CPG reste l'une des techniques d'analyses les plus utilisées, l'identification des constituants d'une huile essentielle est difficilement réalisable uniquement par CPG. En effet, le temps de rétention, propre à chaque composé qui dépend des conditions

opérateurs (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, etc.), ne représente pas une base suffisante pour une identification.

### **1.4.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)**

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques.

Les méthodes couplées permettent d'associer la capacité séparative des méthodes chromatographiques (CPG, CLHP) au pouvoir de caractérisation des méthodes spectroscopiques et spectrométriques (IR, RMN, SM). Ainsi, le couplage CPG/SM est devenu incontournable dans les laboratoires de recherche pour le contrôle des huiles essentielles [22]. Par ailleurs, le couplage CPG/SM impose peu de contraintes techniques. Seul l'hélium peut être utilisé comme gaz vecteur car les ions  $\text{He}^+$  formés lors de l'ionisation électronique n'interfèrent pas avec ceux de l'analyse en raison de leur faible rapport  $m/z$ . Tous les types d'injecteurs sont utilisables et les appareils actuels utilisent exclusivement des colonnes capillaires. Le couplage CPG/SM est la première association réussie d'une méthode chromatographique à la spectrométrie de masse. Mis au point dès la fin des années 1950, il est régulièrement commercialisé depuis 1966. Ce couplage est totalement maîtrisé depuis 1980, le couplage CPG/SM est simple à mettre en œuvre, et plusieurs appareils peuvent fonctionner simultanément sous la surveillance d'un seul responsable. Le domaine d'application de la technique CPG/SM se confond avec celui de la CPG et tous les progrès récents de la CPG ont été transposés à la CPG/SM, notamment en termes de rapidité d'analyse. En analyse qualitative, la CPG/SM produit en routine des spectres reproductibles, identifiables à ceux d'une bibliothèque de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales [27], pour des quantités injectées de l'ordre de  $10^{-10}$  g. En analyse quantitative, des dosages exacts et précis sont obtenus avec une très grande dynamique de réponse, et des limites de détection parmi les plus basses de toutes les techniques d'analyse chimique, à condition de connaître et de disposer au préalable des molécules à quantifier, afin d'établir un étalonnage [28].

### **1.4.3. Acquisition et traitement des données**

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques. La CPG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions

permettant l'ionisation en impact électronique. Un grand nombre de méthodes d'ionisation et d'analyseurs de masse sont utilisables.

La méthodologie d'analyse est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM-IE. L'analyse s'organise en deux étapes ; la première pour le calcul des Ir, polaires et apolaires, et la quantification des composés par CPG/Ir et la deuxième concerne l'analyse par CPG/SM permettant d'obtenir les spectres de masse des divers constituants correspondants [29]. Les fragmentations du chromatogramme sont minutieusement analysées où il faut avoir une meilleure concordance entre le spectre de masse du composé recherché et celui du composé proposé pour valider le choix d'une telle proposition. Quel que soit l'analyseur, le spectre final est comparé à ceux d'une bibliothèque, puis le résultat est donné sous forme de tableau où sont classées en ordre décroissant, les molécules dont les spectres ressemblent le plus à celui soumis à la recherche. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'une huile essentielle. En revanche, si le profil de l'huile est complexe ou qu'elle contient des coélutions de composés, un fractionnement par chromatographie liquide sur colonne ouverte (CLC) ou par chromatographie flash automatisée (CFA), est nécessaire. Les fractions ainsi obtenues sont ensuite analysées. Enfin, une troisième approche peut être mise en œuvre lorsque l'huile essentielle contient un ou plusieurs composés inconnus, qui n'existent pas d'ailleurs dans la bibliothèque conçue au laboratoire et/ou dans les bibliothèques de la littérature. Dans ce cas, l'étude du profil oblige une purification soit par des distillations fractionnées ou par des techniques chromatographiques préparatives, telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ou encore la chromatographie en phase gazeuse préparative (CGP). L'idée de cette approche est d'isoler et purifier les composés inconnus pour aboutir à l'identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles telles que la résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-1H) et celle du carbone-13 (RMN-13C).

#### **I.4.4. Outil statistique**

L'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles est fondamentale pour la détermination des facteurs qui peuvent influencer leur composition chimique comme les critères environnementaux (altitude, nature du sol, climat), physiologiques (morphologie du végétal, stade végétatif) ou encore génétiques. Pour étudier la diversité des huiles essentielles d'une plante, il est indispensable d'effectuer un traitement statistique des données qualitatives et/ou quantitatives relatives aux constituants des matrices étudiées. Pour cela, les deux outils les plus fréquemment utilisés sont l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) [30]. L'ACP est une méthode descriptive qui consiste à déterminer les axes facteurs principaux sur lesquels sont projetés les individus. C'est une méthode très efficace pour l'analyse des données quantitatives sous la forme de tableaux à M observations (individus) sur N variables (constituants). Elle permet de :

- Visualiser et analyser plus rapidement les corrélations entre N variables ;

- Visualiser et analyser les  $M$  observations premières diffusées par  $N$  variables sur des graphiques à deux ou trois dimensions, construits à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible. Dans notre cas,  $M$  sont les stations de récolte des échantillons végétaux tandis que les  $N$  sont les pourcentages (%) des constituants des huiles essentielles.

La Classification Ascendante Hiérarchique a pour but de regrouper les individus en classes homogènes en fonction de l'étude de certaines caractéristiques de ces individus. Elle permet de décrire les données en procédant à une réduction du nombre d'individus. Par classes homogènes, on entend regrouper les individus qui se ressemblent et séparer ceux qui sont éloignés [31]. Dans l'approche CAH, le critère de qualité d'une partition est d'avoir une inertie intra-classe la plus petite possible (ou d'une manière équivalente une inertie interclasse la plus grande possible) en fonction du nombre de classes de chaque partition [32].

### **I.5. Activités biologiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique. Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

Les huiles essentielles ont une double action contre les bactéries : elles peuvent les tuer (effet bactéricide) et elles en arrêtent la prolifération (effet bactériostatique). Les plus puissantes pour cela sont celles qui contiennent des phénols, lesquels sont utiles pour lutter contre les infections bactériennes, virales et parasitaires [33].

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques contenues dans les huiles essentielles, ce qui confère à ces dernières la capacité de combattre certaines pathologies virales, les huiles essentielles arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination du mucus tout en stimulant le système immunitaire [33].

Les aldéhydes contenus dans un grand nombre d'huiles essentielles ont la propriété de combattre les inflammations telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation.

Par ailleurs, les huiles essentielles présentent des propriétés cicatrisantes reconnues depuis l'antiquité et utilisées en temps de guerre pour soigner les blessés. En effet, elles ont le pouvoir de régénérer les tissus qui ont été abîmés et favoriser la cicatrisation des blessures [33].

Un grand nombre d'huiles essentielles ont la capacité d'activer la circulation sanguine, de réduire les hémorroïdes et de soulager les jambes lourdes. Elles ont aussi une action sur le système digestif. Elles sont efficaces contre la formation de gaz au niveau abdominal [33].

## **II. Les Polyphénols**

### **II.1. Introduction**

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux possédant plusieurs groupements phénoliques avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures différentes connues [34]. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc [35-36]. Les classes principales de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxy cinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins et les coumarines [37-38].

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tige, feuille, fleur et fruit [39]. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale [40]. Ces corps jouent un rôle fondamental car ce sont des éléments de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles importantes qu'on trouve chez les végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. L'homme consomme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E [41]. L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires et neuro dégénératives.

### **II.2. Structure chimique et classification**

La structure chimique est commune à tous les polyphénols avec l'existence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient.

On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes [42]. En plus de cette diversité, les phénols sont présents naturellement sous forme conjuguée avec des sucres, des acides organiques et entre eux. Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- Les phénols simples (C6) : un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C6-C1).
- Les flavonoïdes (C6-C3-C6) : 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.



- Les tanins hydrolysables et non-hydrolysables.
- Les stilbènes (C6–C2–C6).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phényl propane.
- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpénoïdes)

Les phytostérols et les phytostanols [43]. Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates [44].

### II.3. Effets biologiques des polyphénols

Associés à de nombreux processus physiologiques, les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire et sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [34].

Les composés polyphénoliques montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériennes, antivirales [45], anti-allergènes, vasodilatatrices [46] et antioxydantes [47].

Ces composés sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs. Parmi les veinotoniques, nous citerons le Relvenet ou le Cirkantrenfermant du ruténoside, le Daflont ou le Diosmilt qui renferment de la diosmine. Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des antiagrégants plaquettaires ou hypotenseurs [40].

### II.4. Flavonoïdes

L'expression flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [48].

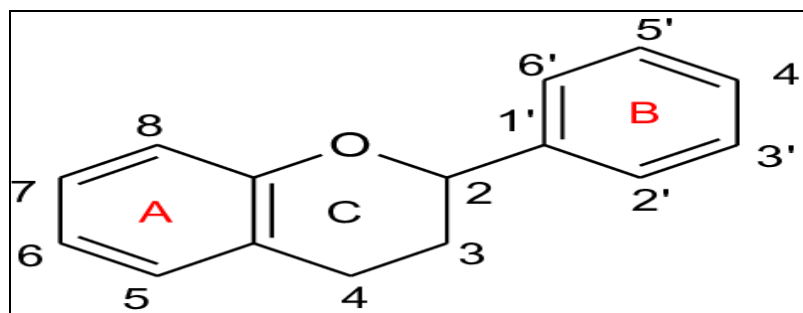


Figure 1 : Structure de base des flavonoïdes [44].

Cependant, d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du mot latin flavus; (flavus=jaune) [49-50]. Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais n'ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui. Ils ont été désignés sous le nom de vitamine P (P étant la première lettre du mot perméabilité), en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité vasculaire. Cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines et que ces substances appartiennent aux flavonoïdes [51].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes ont été multipliés depuis la découverte du célèbre "french paradox" observant à un taux de mortalité cardiovasculaire faible chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [50, 52]. Par ailleurs, près de 4000 flavonoïdes ont été décrits [53].

#### **II.4.1. Structure chimique et classification**

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à quinze atomes de carbone (**Figure 1**), fait de deux cycles aromatiques benzéniques qui désignent les lettres A et B reliés par un hétérocycle oxygéné qui désigne la lettre C [54]. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. La distinction des sous-classes se fait sur la base de la conformation de cette structure centrale.

De façon générale, les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre et sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose ou l'arabinose. Ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères [44].

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : les flavones, les isoflavandiols, les flavanols, les flavondiols, les aures, les chalcones et les anthocyanines [55].

#### **II.4.2. Localisation et distribution**

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tige, feuille, fruit, graine, bois, fleur et pollen [56].

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques [35].

Les flavanones se trouvent dans les agrumes et les isoflavones dans le soja. Les anthocyanes et les flavonols sont d'une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs et qui sont

considérées comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes [35, 48].

### II.4.3. Activités biologiques des flavonoïdes

Comme cela a été démontré par de nombreux travaux, les flavonoïdes constituent des molécules de défense contre plusieurs organismes pathogènes et leurs propriétés ont été exploitées pour leur potentiel thérapeutique contre des microorganismes. On leur reconnaît des activités antivirales, anti tumorales, antiinflammatoires, anti-allergiques et anticancéreuses. Ils ont également des actions positives sur le diabète, les maladies d'Alzheimer et du Parkinson.

### II.5. Tanins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques de structures variées. Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées qui peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [57].

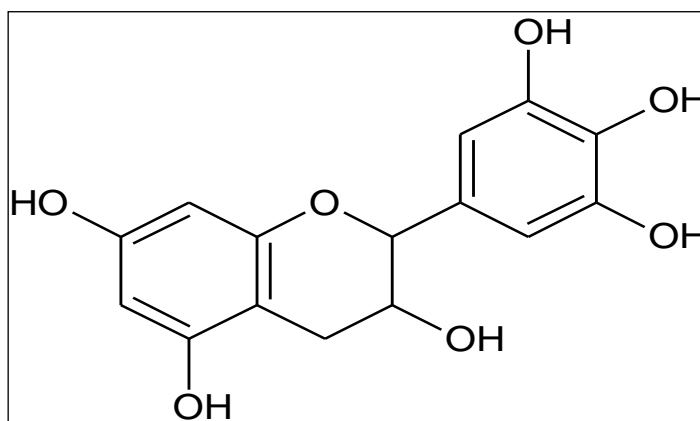


Figure 2 : Structure des tanins [58].

#### II.5.1. Classification

Selon la structure, on distingue habituellement chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : Les tanins hydrolysables et les tanins condensés [35].

- **Tanins hydrolysables** : Ils sont des oligo ou des polyesters de glucides et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitanins [59-60].

- **Tanins condensés ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols** : Ils se diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables. Leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre. Il s'agit de polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, gymnospermes et fougères [35].

### II.5.2. Localisation et distribution

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal où ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les fagacées et les rosacées. Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, la feuille, le fruit, la racine et la graine [61].

### II.5.3. Utilisation des tanins

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tanins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tanins) [62]. Ils sont utilisés comme antidiarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes hémostatiques [63]. Les tanins favorisent aussi la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse et tonifient la peau dans le cas des rides [58].

Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et des peintures [63].

## III. Activités biologiques des plantes

### III.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de produits naturels [64-66].

L'utilisation des antioxydants synthétiques dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique est suspectée à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes [67]. Plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant leur utilisation, leur substitution par des antioxydants naturels s'avère primordial. Les plantes constituent une source importante d'antioxydants naturels. Ces derniers sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs [68].

Un antioxydant peut être défini comme étant toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables

pour retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [69]. On parle de stress oxydatif dès que le système antioxydatif n'est plus capable de prévenir les dégâts occasionnés par les substances oxygénées réactives.

Les antioxydants sont des composés naturels ou synthétiques qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation et protéger le système cellulaire contre les effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive. En particulier, ils stabilisent les radicaux libres et les empêchent de poursuivre leur pouvoir de destruction. Ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dériver ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent aussi en formant des produits finis non radicalaires. D'autres interrompent la réaction en chaîne de peroxydation en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Néanmoins, l'organisme humain n'est pas capable d'assurer la biosynthèse de la plupart des antioxydants, notamment ceux de nature phénolique ; il doit donc aller les chercher dans son alimentation où leur existence est alors indispensable au bon fonctionnement de nos cellules [70-72].

Cette dernière décennie a connu une véritable explosion d'articles scientifiques sur les antioxydants naturels. De très nombreuses études à travers le monde ont démontré l'implication des antioxydants dans la lutte contre diverses pathologies chroniques, tels que le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives, les cancers etc.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante. Ces méthodes diffèrent entre elles en termes de mécanismes de réaction, substrat et antioxydant, états des réactions et la forme dont sont exprimés les résultats. Une meilleure compréhension de ces méthodes contribue à l'interprétation correcte des résultats. Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ne sont pas standardisées. De nombreux facteurs entrent en jeu. En effet, la méthode choisie est fortement liée aux paramètres réactionnels: le solvant, le temps de réaction, le pH, etc. [73] Ces méthodes d'évaluation peuvent varier selon la nature des radicaux libres, ainsi que selon les techniques analytiques impliquées dans le fonctionnement des processus d'oxydation. On décrit ci-dessous quelques méthodes *in vitro* d'investigation de l'activité antioxydante.

### II.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques [74-75].

La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Initialement violet, le DPPH se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes les activités

enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti radicalaire direct des différentes substances phénoliques des extraits [76].

### **III.1.2. Test de réduction du fer FRAP**

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En effet le  $\text{Fe}^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Les ions  $\text{Fe}^{2+}$  à un pH faible, forment un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en  $\text{Fe}^{2+}$  [77-78].

## **III.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne**

Plusieurs recherches ont été concentrées sur l'investigation des produits naturels comme une source de nouvelles molécules bioactives antimicrobiennes pour traiter les maladies infectieuses, d'où l'intérêt de la recherche et le développement de la phytothérapie. Dans cette optique, plusieurs instituts de recherches ont procédé à des investigations dans l'étude de l'activité biologique de plantes médicinales originales de diverses régions du monde. Certains extraits et huiles essentielles de plantes se sont montrés efficaces dans l'inhibition de la croissance d'une grande variété de souches bactériennes.

D'autre part, les risques de contamination microbienne provenant de la manipulation et la conservation des aliments sont de plus en plus fréquents. En outre, le recours croissant à des méthodes de conservation des aliments en utilisant des produits naturels, nécessite le développement de nouvelles méthodes de conservation basées sur l'ajout d'extraits de plantes. Ces méthodes de conservation représentent un besoin vital et pourraient éventuellement être une alternative aux antimicrobiens de synthèse. Il est donc nécessaire de développer des outils aiguisés pour tester l'activité antimicrobienne des produits naturels. On rapporte ci-dessous quelques techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne.

### **III.2.1. La méthode de diffusion sur disque**

La méthode des disques est une technique qualitative qui donne uniquement une idée sur la présence ou l'absence de substances antimicrobiennes. Elle permet d'évaluer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle permet aussi une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier.

Dans cette technique, les agents antimicrobiens de concentration déterminée, diffuseront dans le milieu et inhiberont la croissance des microorganismes sensibles en formant une zone d'inhibition autour du disque. Le principe de la technique est relativement

simple. Elle utilise des disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique déposé à la surface d'une gélose spécifique (Mueller-Hinton) coulée en boîte de pétri uniformément ensemencée d'une suspension de la bactérie étudiée. Lorsqu'un disque imprégné d'antibiotique est placé sur une gélose préalablement inoculée avec la bactérie testée, il s'humidifie et l'antibiotique diffuse relativement dans la gélose en formant ainsi un gradient de concentration. L'antibiotique est présent en forte concentration à proximité du disque et affecte des micro-organismes même faiblement sensibles. Par contre, les organismes résistants se développent jusqu'au disque. Plus, on s'écarte du disque, plus la concentration en antibiotique diminue et seules les bactéries pathogènes les plus sensibles sont affectées [79]. Les diamètres des zones d'inhibition permettent d'apprécier la sensibilité des germes. La lecture des résultats est basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en (mm) qui doivent être uniformément circulaires [80-81].

### III.2.2. La méthode de dilution en milieu liquide

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration plus faible de chaque fraction ne montrant aucune croissance. Celle-ci sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate. Elle est confirmée par la recherche de la concentration minimale bactéricide. La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibiotique qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. La sensibilité d'une bactérie est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique considéré ; c'est la méthode de référence préconisée par l'OMS [82].

### III.3. Activité antifongique

La multirésistance fongique pose de grands problèmes au niveau de la protection des plantes. En effet, il ne reste que peu de produits antifongiques efficaces contre certains agents multirésistants. Les scientifiques sont donc à la recherche de nouveaux produits d'origine naturelle, présentant moins de danger pour la santé. Les huiles essentielles extraites de plantes ont prouvé leur efficacité contre les infections dites fongiques comme les mycoses causées par certains champignons. Il existe différents types de champignons dits pathogènes.

Dans ce travail de thèse, nous avons ciblé les champignons phytopathogènes spécialement ceux qui attaquent les arbres tels que *Penicillium expansum* responsable de la pourriture des fruits (surtout les pommes et les poires), *Fusarium graminearum* qui infecte de nombreuses céréales, les graminées et autres plantes ainsi que *Zymoseptoria tritici* qui est la cause d'une des principales maladies du blé : la septoriose difficile à contrôler. Ces différentes maladies des plantes sont très handicapantes pour l'agriculture car elles affectent la production et entraînent une diminution du rendement et de la qualité [83].

Plusieurs stratégies chimiques permettant de lutter contre l'invasion d'une plante par un champignon, ont été appliquées jusqu'à ce jour. Cependant, et en dépit de leur grande

efficacité dans le contrôle et la protection des récoltes, ces produits de synthèse ont engendré des effets néfastes sur la santé humaine et environnementale [84-85]. En effet, la prise de conscience du coût environnemental de ces pratiques et les craintes des consommateurs du danger que peuvent constituer les résidus de pesticides pour la santé humaine, font naître un intérêt grandissant pour des alternatives non toxiques. En effet, la communauté scientifique s'est donc vue obligée de rechercher de nouveaux produits aussi efficaces que les produits de synthèse et avec un minimum d'effets sur l'homme et l'environnement. La recherche s'est donc orientée vers les composés naturels issus des plantes comme les huiles essentielles qui pourraient être des composés alternatifs aux fongicides.





*Chapitre II : Description des  
plantes étudiées*

## I. L'espèce *Daphne gnidium* L. (Thymeleaceae)

### I.1. Famille des Thymeleaceae

Les Thymelaeaceae sont une petite famille de dicotylédones composée de quelques 1200 espèces réparties en 67 genres. Elles ont des utilisations très diverses qui confèrent une importance économique non négligeable dans les régions où elles poussent. Des espèces des genres *Daphne*, *Dais*, *Dirca* et *Pimelea* sont par exemple cultivées comme arbustes ornementaux aux fleurs parfois persistantes et généralement parfumées. L'écorce de plusieurs genres, particulièrement *Wikstroemia*, *Daphne*, *Edgeworthia* et *Thymelaea*, est exploitée pour la fabrication locale de papier. De l'encens est également recueilli après incision du tronc de certaines espèces de *Wikstroemia*. Dans certaines régions méditerranéennes, l'écorce des espèces de *Daphne* est utilisée pour étourdir chimiquement les poissons. Aux Antilles, *Lagetta linearia* Lam., ou « arbre à dentelle », fournit une écorce décorative [86-87]. Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tempérées de la planète, particulièrement en Afrique et les zones tropicales mais sont absents dans les régions aux climats les plus froids [88].

Les Thymelaeaceae sont réputées être toxiques de par leur teneur en esters diterpéniques de type tiglane ou daphnane [89-90].

#### I.1.1. Description botanique des Thymelaeaceae

Les Thymelaeaceae sont principalement des arbustes et leurs caractères morphologiques principaux sont les suivants [87]

- Feuilles : alternes (rarement opposées) ;
- Fleurs : régulières, bisexuées, pièces florales normalement par 4 ou 5, regroupées en racèmes, en capitules ou en fascicules.
- Fruit : akène, baie, drupe ou parfois capsule, graine possédant peu ou pas d'albumen, embryon droit.

### I.2. Présentation de l'espèce *Daphne gnidium* L.

Les daphnés sont des arbrisseaux ou plantes herbacées annuelles de la famille des Thyméléacées, appartenant au genre « *daphne* » connues en Asie, en Australie, en Europe et en Afrique du nord et qui renferme environ 70 espèces. Parmi les espèces les plus répandues de ce genre : *Daphne mezereum* (L) (Bois gentil), *Daphne laureola* (L) (La lauréole) et *Daphne gnidium* (L) (Le garou) [91].

*Daphne* est le nom de la nymphe Daphné métamorphosée en laurier (Mythologie grecque). Le nom *gnidium* fait référence à Cnide, ville de la Grèce antique.



**Figure 3 :** Espèce *Daphne gnidium* L.

### I.2.1. Description botanique

*D. gnidium* est un arbuste des sables atlantiques et des garrigues méditerranéennes, de 60 cm à 2 m de hauteur ou plus, à rameaux minces très feuillés. Il se caractérise par des racines longues, épaisses, rigides, blanches à l'intérieur et rougeâtres à l'extérieur et existe dans tout le Tell de l'Algérie [92]. Les tiges pouvant atteindre 70 cm à 1 m de hauteur, sont droites, divisées dès leur base en rameaux souples, minces, très feuillés, d'une couleur brune cendrée [93]. Les feuilles persistantes ou caduques sont lancéolées-linéaires, larges de 5 à 7mm au plus, cuspidées et très denses. Les inflorescences terminales sont en panicule rameuse longue de 5-10 cm, entièrement blanches tomenteuses. Les fleurs sont blanches, caduques et odorantes. Le fruit est une baie nue, ovoïde de 5 à 8 mm, d'abord verte, redevenant rouge vif à maturité puis oranger, à épicarpe brillant en murissant avec une seule graine (monosperme). La graine est ovoïde à un seul embryon et à albumen triploïde.

La floraison est longue et s'étale de mars à octobre et c'est pour cette raison que fleurs et fruits coexistent ; il s'agit d'une plante entomogame [92, 94-95].

### I.2.2. Classification systématique (98)

<b>Règne</b>	<b>Plantae (plantes)</b>
<b>Embranchement</b>	Magnoliophyta (plantes à grains)
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe</b>	Rosidées (Eurosidiées)
<b>Ordre</b>	Malvales
<b>Famille</b>	Thymeleacées
<b>Tribu</b>	Daphneae
<b>Genre</b>	Daphne
<b>Espèce</b>	<i>Daphne gnidium</i> L. (1753)
<b>Nom français</b>	Daphné Garou, Thymèle, Sain-bois, Daphné paniculé [96]
<b>Nom anglais</b>	Flax-leaved Daphne (94)
<b>Nom vernaculaire</b>	Lazzaz, inif, methnane (97)

### I.2.3. Utilisation thérapeutique de *Daphne gnidium* L.

*D. gnidium* est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle comme purgative et antiseptique. L'écorce a été utilisée comme un agent diurétique, dans le traitement des douleurs dentaires [88] et contre l'hépatite [89]. Cette plante était utilisée aussi sous forme de pommade aux propriétés épispastiques et cicatrisantes ainsi que dans les traitements des affections dartreuses et de la syphilis [89, 99]. Les feuilles en infusion ont été employées comme un agent hypoglycémiant [100], pour le traitement des maladies cutanées et dans les avortements [99, 101].

En phytothérapie, la plante est indiquée aussi dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides, la sclérose en plaque, le sida ainsi que contre la gale [102-104]. De plus, les femmes l'utilisaient autrefois pour teindre leurs cheveux en noir. En effet, au Maroc, les feuilles séchées et pulvérisées en mélange avec le henné sont préparées pour traiter les cheveux. La plante est aussi utilisée dans les soins capillaires pour le lissage des cheveux et contre les pellicules [95].

### I.1.4. Toxicité de *Daphne gnidium* L.

Cette plante est considérée comme dangereuse en raison de sa toxicité mortelle qui provient plus particulièrement des fruits et des écorces. Cette toxicité est due à la présence d'une résine vésicante, la mézéréine, associée à un hétéroside âcre, la daphnine qui donne par hydrolyse la dihydroxycoumarine [91, 93].

L'écorce des tiges et des racines est vésicante et peut provoquer une rubéfaction intense par frottement sur la peau [88, 104]. L'ingestion des fruits déclenche une ulcération du tube digestif avec nausées, des spasmes digestifs violents, la diarrhée, du vomissement, des

convulsions et la difficulté de déglutition. En outre, une dose de 12 baies pourrait être mortelle chez l'adulte [91, 101].

### I.2.5. Travaux scientifiques réalisés sur *Daphne gnidium* L.

La première espèce à laquelle nous nous sommes intéressés a été, jusqu'à nos jours, moyennement étudiée.

*D. gnidium* L. appartient aux Thymelaeaceae, une famille relativement méconnue (difficultés dans la classification botanique) possédant par contre des utilisations traditionnelles très nombreuses en dépit de la toxicité de certaines espèces.

Par rapport aux travaux et aux publications consacrés aux Asteraceae et aux Fabaceae par exemple, la famille des Thymelaeaceae reste très peu étudiée.

Dans ce qui suit, nous allons donner un aperçu sur les métabolites secondaires produits par les Thymelaeaceae en général et par *D. gnidium* L. en particulier, ainsi que leurs activités biologiques.

Une attention particulière a été portée sur la classe de composés la plus caractéristique des Thymelaeaceae : les diterpènes. En effet, ils sont responsables de la toxicité de ces plantes qui restent quand même utilisées en médecine traditionnelle. Bien que ces diterpènes soient d'une grande variabilité structurale, ils dérivent tous des squelettes de base tigliane et daphnane [105].

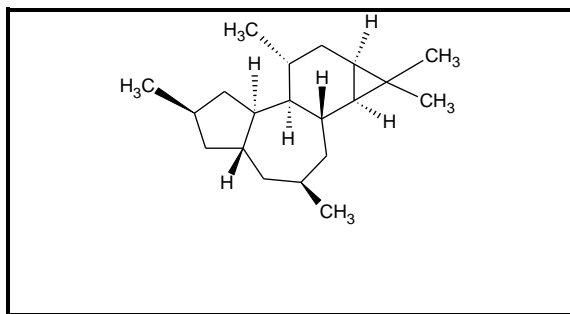


Figure 4 : Structure de Tiglane

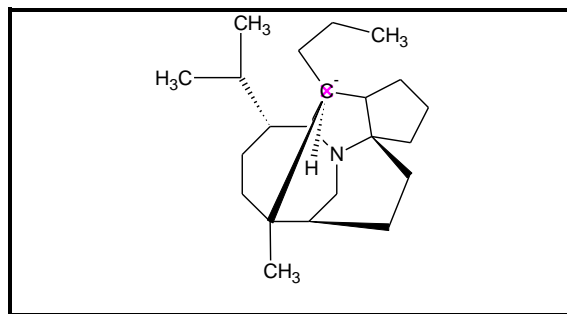
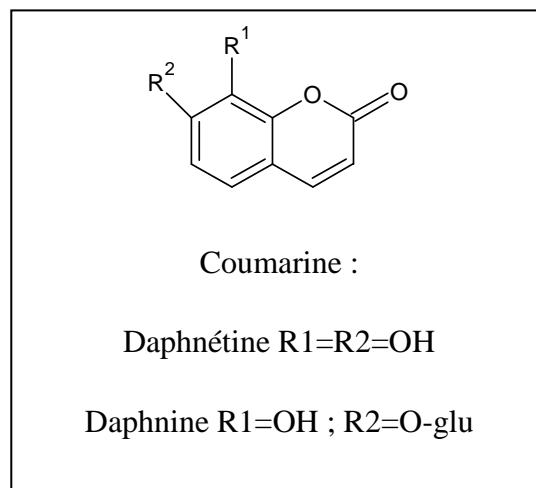


Figure 5 : Structure de Daphnane

Par ailleurs, les Thymelaeaceae contiennent une autre classe intéressante de métabolites secondaires : les coumarines. Isolées initialement des différentes espèces de *Daphne*, nous y trouvons la daphnétine et ses dérivés comme la daphnine.



**Figure 6 :** Structure des coumarines Daphnétine et Daphnine

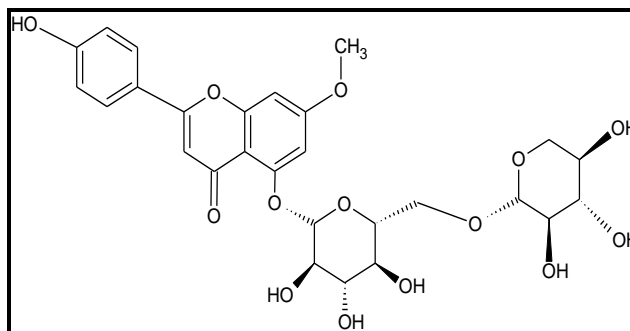
D'autre part, quoique les coumarines soient largement répandues dans les plantes, une petite quantité de bicoumarines a été répertoriée à ce jour chez les Thymelaeaceae où la première bicoumarine isolée de cette famille était la daphnorétine [106].

Une autre caractéristique des Thymelaeaceae est la diversité de leur métabolisme flavonoïdique. Nous y rencontrons des flavones, des flavonols, des flavanones, des C-glycosyl flavones, ainsi que des biflavonoïdes [107].

La littérature rapporte que diverses espèces de *Daphne* contiennent plusieurs types de métabolites secondaires tels que les coumarines, les flavonoïdes, les lignanes, les diterpènes et les triterpénoïdes [108].

En parallèle, de nombreuses activités biologiques ont également été documentées : les activités anti-inflammatoires, antioxydantes, cytotoxiques, anti tumorales et antimicrobiennes [109].

En effet, l'investigation phytochimique des tiges de *D. gnidium* a permis d'isoler quatre coumarines (daphnétine, daphnine, acétylumbelliférone et daphnorétine) et sept flavonoïdes (lutéoline, orientine, isoorientine, apigénine-7-O-glucoside, genkwanine, 5-O-β-D-primeverosylgenkwanine et 2,5,7,4 -tétrahydroxyisoflavanol) dont les structures ont été déterminées par comparaison de leurs propriétés physiques (UV, IR, SM, RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) ; des composés reconnus pour leurs effets antimicrobiens contre *Bacillus lentus* et *Escherichia coli* [108].



**Figure 7 :** Structure de Yuankanin

Par ailleurs, un screening phytochimique de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de *D. gnidium* a été réalisé afin de mettre en évidence les tannins, les flavonoïdes et les coumarines où une quantification des contenus en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins a été effectuée en utilisant respectivement les réactifs spécifiques Folin-Ciocalteu,  $\text{AlCl}_3$  et Folin-Denis [110].

Les Thymelaeaceae en général, ne constituent pas une famille de plantes à huiles essentielles, mais de nombreux genres comme la *Daphne* produisent des fleurs odorantes qui pourraient être riches en résine et en huile essentielle. Cependant, aucun travail sur l'huile essentielle ni sur l'hydrolat de *D. gnidium* n'a été rapporté jusqu'à ce jour.

Quant aux autres travaux répertoriés sur *D. gnidium*, de nombreux criblages à large échelle ont été réalisés, à la recherche d'activités biologiques des plus diverses. En effet, beaucoup d'extraits bruts ont été soumis aux tests biologiques et biochimiques, afin d'évaluer leur potentiel bioactif.

Les groupes phytochimiques précédemment cités sont constitués de composés antimicrobiens dont leur présence dans les extraits végétaux ne pourrait donc que justifier l'activité observée. En effet, dans les années 1996 et 1997, Lauk et al. ont évalué les extraits méthanoliques des feuilles et de l'écorce de *D. gnidium* pour leurs activités antibactérienne et antimycotique [111-112].

Une année après, Il a été prouvé que l'extrait d'écorce de cette plante provoque des lésions cutanées photochimiques [113].

Une activité antivirale exercée par des diterpènes des parties aériennes de *D. gnidium* (daphnetoxine, gnidicine, gniditrine et excoecariatoxine) a été mise en évidence [102]. Cependant, certains composés comme la daphnorétine et l'apigénine se trouvant dans les feuilles, ont montré une activité antitumorale intéressante [114]. Une investigation sur la même activité a été poursuivie en 2014 où Chaabane et al. [115] ont étudié la capacité inhibitrice des extraits de chloroforme, de méthanol et de butanol des feuilles de *D. gnidium* qui ont révélé une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires de mélanome (B16 F0 et B16 F10) ; deux types de cellules cancéreuses de la peau chez des souris.

De plus, les extraits de feuilles de *D. gnidium* ont montré une activité anti-leucémique marquée en perturbant le cycle cellulaire de K562 et par l'inhibition de la P-glycoprotéine humaine dans la lignée cellulaire K562/R7 [103].

Chaouki et ses collaborateurs [116] ont rapporté que l'extrait d'acétate d'éthyle des racines de *D. gnidium* exerce aussi un effet apoptotique et antiprolifératif sur les cellules du cancer du poumon et de l'hépatome.

Dans une autre étude, les effets de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de *D. gnidium* à 100 µg/mL sur la fonction cellulaire immunitaire ont été évalués *in vitro* sur des souris. Les résultats obtenus ont montré que cet extrait agit comme anti-inflammatoire en inhibant la prolifération des macrophages et des lymphocytes chez ces souris. Cette activité anti-inflammatoire a été examinée en mesurant la sécrétion des molécules pro-inflammatoires: l'I1-1 $\beta$ , NO et TNF-  $\alpha$  [110].

D'autre part, l'activité antifongique réalisée par Mohammedi et Atik [117] a montré qu'à la concentration de 10 µg/mL, l'extrait de feuilles de *D. gnidium* exerce une inhibition de 94 % sur la synthèse de l'aflatoxine B1 de *Aspergillus flavus*.

La richesse des différentes parties de *D. gnidium* en polyphénols et en flavonoïdes lui confère une activité antioxydante testée par l'inhibition de la peroxydation lipidique, *in vitro*, par des systèmes d'auto-oxydation et de l'oxydation l'acide linoléique par l'intermédiaire du fer ou de l'EDTA [118]. La présente étude a démontré que certains extraits des feuilles de *D. gnidium* possèdent de puissantes activités antioxydantes et anti génotoxiques qui pourraient être attribuées aux composés tels que les flavonoïdes et les polyphénols [118].

Enfin, une étude récente a montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *D. gnidium*, testé *in vivo*, présente des effets antigénotoxiques avec des activités antioxydantes et des effets neuroprotecteurs élevés par l'inhibition de butyryl-cholinestérase [119].

L'absence de données sur la composition chimique des huiles essentielles et des hydrolats de *D. gnidium* L. nous a conduit à investiguer les métabolites volatiles et à évaluer leur potentiel en termes d'activités biologiques.

## II. L'espèce *Atractylis humilis* (Asteraceae)

### II.1. Famille des Astéracées

Les Astéracées, appelées aussi « Composées » sont les plantes angiospermes dicotylédones (principalement herbacées) appartenant aux classes des gamopétales ou astérides (Asteridae) et à l'ordre des Astérales. Il s'agit de la famille des Phanérogames la plus vaste, avec près de 1500 genres et plus de 26000 espèces dont 750 endémiques (suivant les sources) et elle est la seconde en importance derrière celle des orchidacées. Elle est présente dans toutes les régions du monde, principalement dans les régions tempérées et à l'exception des pôles [120]. Les Composées ont une distribution mondiale importante se



caractérisant par une large diversification écologique. Toutefois, elles sont abondantes, principalement dans les régions tropicales et subtropicales bordant les zones semi-arides et désertiques mais elles sont moins fréquentes dans les forêts tropicales.

Les Astéracées peuvent être annuelles, bisannuelles ou vivaces. On y trouve surtout des plantes vivaces et à feuilles alternes. Dans la plupart des cas, les Astéracées sont des plantes herbacées mais elles sont également représentées par des arbres, des arbustes ou des lianes dont certaines sont également succulentes [121].

### II.1.1. Description botanique des Asteracées

Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige ou entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée un involucre [121]. La fleur des Astéracées est très particulière : les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates, sont situées des "brosses à pollen".

L'inflorescence est ordinairement un compact de fleurs sessiles tubulées et/ou ligulées sous tendu par un involucre de bractées disposées sur un ou plusieurs rangs. Les bractées peuvent être herbacées, scarieuses ou épineuses. Sur le réceptacle, les bractéoles, si elles sont présentes, peuvent prendre la forme d'écailles, de soies ou de paillettes. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre.

Le fruit est un akène généralement surmonté d'un pappus (une aigrette de soies correspondant au calice persistant). Le but du pappus est de favoriser la dispersion des graines par le vent (anémochorie). Les caractères du fruit sont généralement identiques pour les diverses espèces du même genre [122].

### II.1.2. Applications médicales et intérêt, commercial, nutritionnel et pharmacologique des Astéracées

La famille des astéracées occupe une place tout à fait singulière dans des revues médicales grâce surtout aux lactones sesquiterpéniques qu'elle contient. Ces composés phytochimiques sont une cause importante de la dermatite de contact [123].

L'utilisation thérapeutique majeure des astéracées est due essentiellement à leurs activités anti inflammatoires et antimicrobiennes. En effet, les Astéracées sont largement utilisées en médecine populaire pour guérir bon nombre de maladies [124] :

- *Artemisia annua*: Armoise (artémisine) contre la malaria et le cancer
- *Arnica montana* : traitement naturel des arthrites
- *Chamaemelum nobile* (Camomille romaine) : antispasmodique, digestif
- *Matricaria recutita* (Camomille vraie) : traitement symptomatique de troubles digestifs

- *Silybum marianum* (Chardon marie) : traitement des troubles liés au foie et à la vésicule biliaire
- *Tanacetum* sp (pyrèthre) : insecticide
- *Tussilago* : tussilage pectoral

## II.2. Présentation de l'espèce *Atractylis humilis*

Dans la famille des Astéracées, le genre *Atractylis* comporte une trentaine d'espèces localisées sur le bord et les îles de la Méditerranée. Au moins, seize espèces sont présentes en Algérie où *Atractylis humilis*, largement répandue, se développe en populations de faibles effectifs disséminés au sein des pinèdes claires. D'un caractère thermophile et clairsemé, ce taxon affectionne plutôt les pelouses sèches bien ouvertes. Cette espèce rare est protégée régionalement. Elle est également inscrite sur le livre rouge de la flore menacée en France.

*Atractylis humilis* est une espèce liée aux sols squelettiques (lithosols, croûtes calcaires plus ou moins superficielles) [125].

**Nom :** Atractyle humble.

**Nom scientifique :** *Atractylis humilis* L., *Atractylis coespitosa* L.

**Nom vernaculaire :** Knoud [126], Kounida, Taboq [92].

**Nom français :** Chardon [126].



**Figure 8 :** Espèce *Atractylis humilis* L.

### II.2.1. Description botanique

L'espèce *A. humilis* est une plante annuelle, vivace, épineuse à faibles épines. Cette plante croit dans les forêts sur les zones rocheuses et les sols pierreux. Elle comporte en effet, deux parties :

#### ✚ Partie Aérienne

Les tiges sont droites, longues de 1-2 dm, glabres. Son involucre est cylindrique, court, glabre, formé d'écailles imbriquées, tronquées au sommet. Il s'agit d'une plante à petites feuilles, lancéolées, couvertes sur les deux faces d'une pubescence grise, régulièrement dentées épineuses. Les capitules de 15mm sont globuleux ; les akènes sont couverts de poils blancs, laineux ; les fleurs du rayon purpurines constituent des touffes épaisses, les extérieures plus longues, parfois rayonnantes. Sa période de floraison est de juillet jusqu'à septembre [92].

#### ✚ Partie souterraine

Les organes souterrains de couleur grise à l'état frais sont odorants. Les racines sont développées et accompagnées de fines racines.

### II.2.2. Classification systématique

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Clade</b>	Campanulidées
<b>Ordre</b>	Asterales
<b>Famille</b>	Asteraceae
<b>Sous famille</b>	Cardueoideae
<b>Tribu</b>	Cardueae
<b>Sous-tribu</b>	Carlininae
<b>Genre</b>	<i>Atractylis</i>
<b>Espèce</b>	<i>Atractylis humilis</i> L.,1753

### II.2.3. Usage thérapeutique et Toxicité

Le genre *Atractylis* a de nombreuses propriétés médicinales. Dans le bassin méditerranéen, il a été utilisé pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, de l'obésité et comme émétique dans l'intoxication par morsure de serpent. Il était également connu comme antipyrétique pour traiter les maux de tête et les rhumes par fumigation. La poudre de la racine, lorsqu'elle est appliquée à l'extérieur, agit contre les furoncles et les verrues. Dans la médecine populaire d'Afrique du Nord, les espèces du genre *Atractylis* traitaient les ulcères syphilitiques et ont été employées pour provoquer les avortements et blanchir les dents [127-130].

Localement, dans la région de Tlemcen, *A. humilis* a été considéré comme un remède naturel efficace pour le traitement de diverses maladies. En effet, les racines décoctées sont utilisées contre les affections gastro-intestinales [126] et les infections des voies urinaires,

ainsi que les maladies du colon. *A. humilis* est aussi utilisée dans le traitement du goitre (à raison d'une cuillerée à café de poudre avec du miel tous les matins). De plus, très peu de personnes l'utilisent contre le diabète. Par ailleurs, les cendres de la partie aérienne mélangées à de l'huile de cade, ont servi pour traiter les maladies de la peau comme l'eczéma et la gale. En outre, contrairement à d'autres espèces de *Atractylis*, aucun symptôme d'intoxication n'a été observé lors de l'utilisation de *A. humilis* quoique jusqu'à présent, aucune donnée scientifique n'est disponible à ce sujet [131].

#### II.2.4. Travaux scientifiques réalisés sur *Atractylis humilis*

A la lecture de la recherche bibliographique réalisée sur le genre *Atractylis*, il s'avère que beaucoup d'activités biologiques ont été investiguées, à savoir les activités anti-inflammatoires, antipyrétiques [132], antioxydantes, anticholinestérasiques [133-134], antitumorales [135] et antileishmaniales [136]. Cependant, à nos jours, les espèces de *Atractylis* ont fait l'objet de peu d'études phytochimiques où *A. gummifera* L. est toujours la plus étudiée.

Des recherches antérieures sur ce genre ont permis d'isoler et de caractériser des métabolites secondaires, notamment des alcaloïdes [133], des glycosides [136], des glycosides flavonoïdes, des triterpénoïdes et des composés phénoliques [137-138]. D'autres composés bioactifs sont également présents dans quelques espèces de *Atractylis* tels que les coumarines, les phénylpropanoïdes, les stéroïdes, les benzoquinones et les polysaccharides [128].

En ce qui concerne l'espèce *A. humilis*, aucune étude phytochimique n'a été réalisée auparavant, à l'exception d'une étude récente qui a révélé la présence de différentes classes de composés phytochimiques, notamment les flavonoïdes, les triterpènes, les composés phénoliques et les osides [139]. De plus, la même étude a permis d'isoler et d'identifier un cyclolignane, ainsi que treize composés phytochimiques provenant des extraits d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol, dont les structures ont été déterminées par analyse spectroscopique (1D et 2D-RMN, HR-ESI-MS). En 1991, Gaudeau et Gouthiere ont montré l'efficacité de cette espèce dans le traitement de pathologies cancéreuses, inflammatoires et immuno-dépressives [131].

D'autre part, une activité insecticide a été mise en évidence, c'est celle exercée par des extraits aux solvants organiques de la partie aérienne où l'extrait hexanique a montré une activité de 0-39% de mortalité [140].

Par ailleurs, aucune étude sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes n'a été faite sur cette plante.



*Chapitre III : Matériel et  
méthodes*

## I. Enquête ethnobotanique

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont constitué une source inépuisable pour les thérapeutes traditionnels afin de guérir les malades de certaines pathologies. Cette pratique est très prisée, surtout dans les zones rurales souvent pauvres et dépourvues de structures sanitaires.

Afin de rassembler tous les renseignements et constituer une source d'informations très précieuse, prête à être exploitée sur le plan scientifique, un travail de terrain doit être effectué. La méthodologie consiste à mener une enquête ethnobotanique auprès d'herboristes, de tradipraticiens et de personnes souvent âgées vivant en contact avec les plantes médicinales et ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle.

Parmi toutes les plantes médicinales locales, notre choix s'est porté sur *Daphne gnidium* L. et *Atractylis humilis* L. deux espèces végétales sous utilisées et que l'on rencontre dans la région de Tlemcen (Nord-ouest d'Algérie).

La wilaya de Tlemcen qui constitue la zone d'étude, occupe une position géographique de choix au sein de l'ensemble national. Elle est située sur le littoral nord-ouest du pays et dispose d'une façade maritime de 150 km. Elle est délimitée à l'ouest par le Maroc avec superficie de 9017.69 km<sup>2</sup>, la mer méditerranée au nord, la wilaya de Ain Témouchent à l'est et la wilaya de Naama au sud. Le chef-lieu de la wilaya est situé à 432 km à l'ouest de la capitale, Alger. Conformément à la dernière organisation territoriale du pays, la wilaya de Tlemcen regroupe actuellement 20 daïras et 53 communes. La population totale de la wilaya est de 949 135 habitants. La wilaya de Tlemcen a un climat méditerranéen, et repose sur l'opposition entre un hiver océanique où la wilaya est ouverte aux dépressions maritimes et un été désertique qui provoque la remontée et le stationnement d'une chaleur persistante [141].

L'enquête ethnobotanique a été menée à l'aide d'un questionnaire soumis aux enquêtés en réalisant des entretiens individuels. Le formulaire du questionnaire (**Annexe 1**) se divise en trois parties permettant de récolter des informations portant sur l'informateur, sur chacune des deux plantes étudiées et sur leurs utilisations traditionnelles par la population locale.

1. L'informant : prénom, âge, sexe, niveau d'étude et origine de l'information.
2. L'information sur les plantes
  - Fréquence d'utilisation des plantes ;
  - Nom des plantes : nom vernaculaire, nom scientifique ;
  - Période de collecte
  - Parties utilisées : tiges, racines, feuilles, graines, partie aérienne, ... ;
  - Usage de la plante.
  - Mode de préparation : poudre, décoction, macération, infusion, autre ;
  - Mode d'administration.

## 3. Utilisation traditionnelle

- Type de maladie
- Toxicité

Autre information sur la plante.

Cette partie de ce travail a duré plus d'un an, pendant lequel, nous avons réalisé 80 entretiens dont le temps consacré à chaque entrevue est d'environ dix minutes. Les différentes personnes questionnées sont âgées de 19 à 60 ans et plus.

## II. Matériel végétal (Echantillonnage, Séchage et Conservation)

L'authentification taxonomique des deux espèces *Daphne gnidium* et *Atractylis humilis* a été faite par Messieurs Dr. Baba Ali et Dr. Hassani Fayçal du département de biologie de la faculté SNV/STU de Tlemcen.

Pour chaque espèce étudiée, le lieu de provenance du matériel végétal ainsi que la date de récolte sont mentionnés ci-dessous.

➤ *Daphne gnidium*

La partie aérienne de *D. gnidium* a été récoltée en Février 2017 dans la région de Zelboun à environ 9 km au nord-ouest de Tlemcen, Algérie [914 m, 34°51'30.06''N ; 1°25'1.17''O] avec un voucher de DG.AA.022017.

➤ *Atractylis humilis*

La cueillette de la partie souterraine (la racine) et la partie aérienne (la tige et les feuilles) a eu lieu au mois de septembre 2018 à partir des différentes stations de la wilaya de Tlemcen. Les coordonnées géographiques des lieux de récolte et le numéro de référence de chaque échantillon sont cités dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1** : Données géographiques des zones d'études de *Atractylis humilis* L.

Région	Coordonnées GPS	N° Voucher code	Altitude(m)
Ouled ouadfel	34°49'57.28"N; 1°19'12.03"O	AH-0918-A1	1128
Ain fezza	34°51'44.98"N; 1°12'2.59"O	AH-0918-A2	1029
Mafrouch	34°50'49.87"N ; 1°17'53.73"O	AH-0918-A3	1109
Harrachi	34°49'54.43"N ; 1°21'49.90"O	AH-0918-A4	1189
Sidi aissa	34°54'24.82"N; 1°15'10.32"O	AH-0918-A5	812
Terni	34°47'35.25"N ; 1°21'38.34"O	AH-0918-A6	1210
Khenous	34°47'47.03"N ; 1°26'25.75"O	AH-0918-A7	1228
Zalboun	34°51'30.06"N ; 1°25'1.17"O	AH-0918-A8	914

Le matériel végétal est débarrassé des débris, puis étalé sur du carton étendu par terre ensuite laissé sécher à l'abri de la lumière dans un endroit bien aéré. Le matériel végétal est disposé par fines couches et remué de temps à autre afin de le sécher jusqu'à son usage.

### III. Extraction solide-liquide des plantes

#### III.1. Principe de l'extraction par soxhlet

L'extraction par soxhlet est une méthode classique utilisée pour extraire les différents métabolites à partir de plantes en raison de sa commodité. La poudre de la plante est placée dans une cartouche en papier filtre, mise dans le corps de l'extracteur. Quand le ballon contenant le solvant est chauffé, les vapeurs se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps dans lequel est insérée la cartouche faisant extraire la plante par solvant. Après l'accumulation du solvant condensé dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, le retour dans le ballon du liquide riche en substances extraites est provoqué. La continuité du processus constitue l'avantage majeur de cette méthode [142-143].

L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction qui s'écoule devient de plus en plus clair, c'est-à-dire avec une concentration négligeable de soluté.

Afin d'éliminer le solvant et récupérer l'extrait, une évaporation sous vide, en utilisant un appareil 'Rotavapor', a été faite. L'évaporateur rotatif est une technique rapide et efficace de séparation : elle permet l'extraction d'un solvant dont la température d'ébullition est abaissée en travaillant sous pression réduite.

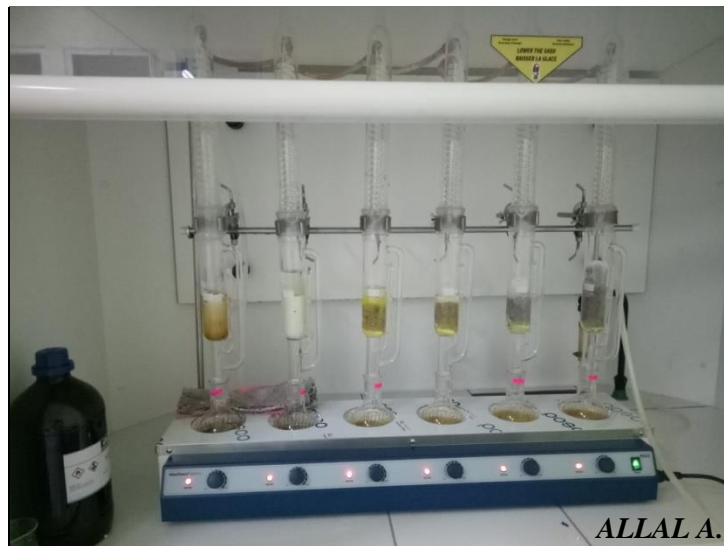


Figure 9 : Extracteurs de type soxhlet



## III.2. Expérimentation

L'extrait Aqueux et l'extrait méthanolique sont préparés par épuisement de la matière végétale, où 25g de la matière végétale a été mise dans une cartouche. Cette dernière est ensuite introduite dans le soxhlet dont le ballon contient un volume 200 mL de solvant. Quelques pierres ponce ont été ajoutées dans le ballon pour éviter tout risque de surchauffe locale au cours de l'extraction. Après épuisement, Le mélange est filtré et l'extrait obtenu est concentré à sec dans un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide puis conservé dans un flacon stérile.

Le rendement en extrait brut est obtenu en calculant le rapport entre la masse de l'extrait et la masse du matériel végétal sec utilisé pour l'extraction.

Ce rendement est calculé par la formule :

$$R(\%) = (m/m_0) \times 100$$

R : Rendement en %,

m : Masse en grammes de l'extrait sec évaporé,

m<sub>0</sub> : Masse en grammes du matériel végétal initial sec.

## IV. Analyses phytochimiques

### IV.1. Screening phytochimique

La partie aérienne de chacune des deux espèces ainsi que la racine de *A. humilis* sont soumises aux tests phytochimiques. Ces derniers permettent de déceler la présence des groupes de familles chimiques dans une plante donnée. Le but final de l'étude des plantes médicinales est d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de l'espèce en question. L'examen phytochimique qualitatif se réfère aux techniques basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation.

#### ❖ Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud :

L'extrait aqueux est soumis aux différents tests cités ci-dessous :

##### 1. Amidon :

Le test effectué consiste à traiter 5 mL de l'extrait aqueux avec le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

## 2. Composés réducteurs :

Le test consiste à ajouter 2 mL de la solution aqueuse 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling. La solution résultante est ensuite chauffée. Un précipité rouge brique marque la présence des hydrates de carbone.

## 3. Saponosides :

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 mL de l'extrait aqueux. Après agitation, le mélange est abandonné pendant 20 min et la teneur en saponosides est évaluée :

Pas de mousse = test négatif (-) ;

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif (+) ;

Mousse de 1-2cm = test positif (++) ;

Mousse plus de 2cm = test très positif (+++) [144]

## 4. Les tanins :

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1mL de l'extrait aqueux, 1mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub>. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins [144].

### ❖ Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol :

L'extrait éthanolique est soumis aux tests cités ci-dessous :

#### 1. Alcaloïdes sels :

On évapore 20 mL de la solution éthanolique à sec. On ajoute 5 mL de HCl 2N au résidu et on chauffe dans un bain-marie. On filtre le mélange puis on divise le filtrat en deux parties égales. On traite la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner.

Observation : présence de turbidité ou précipitation

(+) est enregistré si le réactif produit une légère opacité

(++) est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation

(+++) est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd

## 2. Flavonoïdes :

On traite 5 mL d'extrait alcoolique avec quelques gouttes de HCl concentré et 0.5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de 3 min [145].

## 3. Tanins :

A 1 mL de solution alcoolique, on ajoute 2 mL d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de  $FeCl_3$  diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tanins cathéchiques), bleu-verte (tanins galliques) [144].

## 4. Composés réducteurs :

On traite 1mL de l'extrait éthanolique avec 2 mL d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis on chauffe. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique [144].

## 5. Coumarines :

On évapore 5mL de la solution extractive étherée. On dissout le résidu dans 1 à 2 mL d'eau chaude. On divise le volume en deux parties puis on prend la moitié du volume comme témoin et on ajoute à l'autre moitié 0.5 mL de  $NH_4OH$  (10 %). Ensuite, on met deux taches sur un papier filtre et on les examine sous la lumière U.V. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines [144].

## 6. Stérols et stéroïdes :

On évapore 10 mL d'extrait alcoolique. Le résidu ainsi obtenu est traité avec 10 mL de chloroforme anhydre. Après filtration, on mélange 5 mL de la solution chloroformique avec 5 mL d'anhydre acétique puis on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On agite et on laisse reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité) après 30 min à  $21C^{\circ}$  [144].

## IV.2. Analyses quantitatives des extraits

### IV.2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux [146]

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été effectuée par spectrophotométrie UV-Visible selon la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu.

#### ➤ Mode opératoire :

Dans un tube à essai, on introduit 0.2 mL de l'extrait aqueux, 0.8 mL de la solution de  $Na_2CO_3$  à 7.5 % et on agite. 1 mL de la solution de Folin Ciocalteu (10 mL du réactif Folin Ciocalteu + 90 mL d'eau distillée) y est additionné. L'ensemble est incubé à une température ambiante pendant deux heures. La lecture est effectuée contre un blanc sans extrait à 760 nm.

➤ **Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique :**

Une gamme étalon de solutions d'acide gallique de concentrations allant de 0.01 à 0.2 mg/mL a été établie pour calculer la concentration des composés phénoliques dans chaque extrait. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique /g d'extrait (**Annexe 2**).

**IV.2.2. Dosages des flavonoïdes :[147]**

➤ **Mode opératoire :**

Dans un tube à essais, on introduit 1 mL de l'extrait méthanolique auquel est ajouté 1mL de la solution de  $AlCl_3$  (2 % dans le méthanol). Le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

➤ **Préparation de la courbe d'étalonnage de la quercétine :**

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la quercétine comme contrôle positif. Une gamme de 10 concentrations de quercétine allant de 40 à 2.5 mg/mL a été préparée à partir d'une solution mère à 400 mg/mL. La teneur en flavonoïdes est exprimée en (mg Eq / g d'extrait) (**Annexe 3**).

**IV.2.3. Dosage des tanins : [147]**

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré dont l'absorbance est mesurée à 500 nm.

➤ **Mode opératoire :**

Dans un erlenmeyer, on introduit 5 mL du réactif d'analyse qui contient : 2.5 mL de la solution de vanilline à 1% mélangée à 2,5 mL de la solution de HCl à 8% (8 mL de HCl complétés à 100 mL avec du méthanol). On ajoute 1 mL de l'échantillon (préparé dans le méthanol) et on agite le mélange pendant une minute. On additionne 5mL de la solution de HCl à 4%. L'erlenmeyer est ensuite introduit dans un bain marie à 30°C et laissé pendant 20 min La lecture des absorbances est faite à 500 nm.

➤ **Préparation de la courbe d'étalonnage de la catéchine :**

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Une gamme de concentrations de la catéchine allant de 0.3 à 0.06 mg/mL a été préparée à partir d'une solution mère à 4.4 mg/mL (**Annexe 4**).

## V. Caractérisation de la partie volatile des plantes

### V.1. Principe de l'hydrodistillation

Dans un laboratoire de recherche, plusieurs techniques ont été utilisées pour produire les huiles essentielles à partir de plantes aromatiques fraîches ou sèches. Le montage le plus souvent adopté est celui utilisant l'appareil de la distillation se basant sur la publication de Clevenger en 1928 et qui a été modifié plus tard. L'un de ces appareils modifiés décrit par Coking et Middleton en 1935 a été introduit dans la pharmacopée européenne et plusieurs autres pharmacopées.

Ce montage est constitué d'un ballon surmonté d'un essencier de type Clevenger. La plante introduite dans le ballon est mélangée avec de l'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes entraînées par chauffage sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle obtenue se sépare de l'hydrolat par une simple différence de densité. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter.



Figure 10 : Montage de l'hydrodistillation de type Clevenger

### V.2. Protocole d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle des deux plantes étudiées a été réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé à l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil afin d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.

Une quantité de 500 g du matériel végétal est déposée dans un ballon de six litres rempli presque au deux tiers. Le chauffage est mis en marche en opérant une ébullition douce pendant 4 heures. Le réfrigérant est mis en fonction en réglant le débit d'eau. La vapeur

condensée au réfrigérant conduit à une phase organique (huile essentielle) qui se sépare d'une phase aqueuse (hydrolat) par simple décantation.

Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant (sulfate de magnésium anhydre) ; c'est l'opération de séchage.

L'huile essentielle est, par la suite, récupérée dans des piluliers en verre ambré et conservée au congélateur à 4°C avant d'être analysée. Le rendement en huile essentielle est exprimé comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal sec.

$$\%HE = (m_1/m_0) \times 100$$

%HE : Rendement en huile essentielle.

$m_1$  : Masse en gramme d'huile essentielle.

$m_0$  : Masse en gramme de la matière végétale sèche.

### V.3. Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat :

La mise en évidence de l'importance des hydrolats fait l'objet depuis quelques années, d'un intérêt croissant. La caractérisation de cette phase aqueuse chargée en composés hydrosolubles s'inscrit aussi dans une démarche de production plus écologique en valorisant une matière jusqu'alors considérée comme un effluent [148].

Pour chaque extraction, 500 mL d'hydrolat a été récupéré dans des bouteilles en verre ambré et conservé à l'abri de la chaleur. Le volume total a été soumis à une extraction séquentielle liquide-liquide par un solvant apolaire en utilisant une ampoule à décanter (Figure 11).

L'hydrolat a été traité par 3 fois 50 mL d'éther diéthylique. L'extrait d'hydrolat est obtenu après séchage sur  $MgSO_4$  et évaporation du solvant puis récupéré dans des flacons opaques préalablement pesés.

Le calcul du rendement est défini comme suit :

$$\%HY = [V/V^\circ] \times 100$$

%HY : rendement en extrait d'hydrolat

V : volume de l'extrait d'hydrolat

$V^\circ$  : volume total de l'hydrolat



**Figure 11** : Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat

#### V.4. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles et d'extrait d'hydrolat

Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier et de quantifier un très grand nombre de constituants qui composent une huile essentielle extraite. L'analyse de la partie volatile est réalisée par deux techniques chromatographiques de référence (CPG & CPG/SM). Parfois, d'autres techniques spectroscopiques s'avèrent complémentaires.

L'identification des constituants est réalisée par l'utilisation des indices de rétention sur une colonne polaire et une autre apolaire. L'identification des composants individuels est fondée sur la comparaison des indices de rétention ( $I_r$ ) calculés, sur les colonnes polaires et apolaires, avec ceux de composés authentiques ou ceux rapportés dans la littérature [149-150], et dans les bibliothèques commerciales [149, 151-152], et par l'analyse de chaque spectre de masse des composés constitutifs (utilisation de la banque « Arômes » constituée au Laboratoire des Produits Naturels - Corse).

##### V.4.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses quantitatives ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type « Perkin Elmer Clarus 600 », équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID), d'un seul injecteur diviseur et de deux colonnes :

- Une colonne polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol 60 m x 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film : 0,25  $\mu\text{m}$ ).
- Une colonne apolaire (Rtx-1, polydiméthylsiloxane).
- Le gaz vecteur est l'hélium (1 mL.mn<sup>-1</sup>) avec une pression en tête de colonne de 25 psi.
- La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C.

- La programmation de la température de la colonne est programmée en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C.mn<sup>-1</sup>, puis elle est maintenue à un palier de 45 mn à 230°C.
- L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50.
- Le volume injecté des échantillons est de 0,1 à 0,2 µL selon que l'échantillon soit pur ou dilué dans un solvant.
- Pour chacun des composés, les indices de rétention (Ir) polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane allant de C5 à C30 en programmation de température.

#### V.4.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM)

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type Perkin Elmer Autosystem XL à un spectromètre de masse quadripôle de marque Perkin-Elmer Turbo Mass. doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes :

- Une colonne polaire (Rtx-Wax 60 m x 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film : 0,25 µm),
- Une colonne apolaire (Rtx-1),
- La température de la source d'ions est fixée à 150°C

L'acquisition des données chromatographiques est réalisée en mode SCAN : gamme de masse 35-350 uma avec un pas de 1 s entre les scans. Les spectres de masse sont enregistrés en impact électronique sous un champ de 70 eV.

#### V.4.3. Outil statistique

Les études statistiques ont été menées avec le logiciel R (R Foundation –Institute for Statistics and Mathematics, Autriche). Les Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été réalisées avec des matrices de type Pearson en utilisant la fonction « ACP ». Les Classifications Ascendantes Hierarchiques (CAH) et les dendrogrammes résultants ont été effectuées avec des matrices de dissimilarités calculées en distance euclidienne et la méthode d'agrégation choisie systématiquement est le lien moyen (package « classif »).

## VI. Extraction des acides gras et des insaponifiables

### ❖ Préparation de l'extrait hexanique :

Selon la méthode décrite par Kapseu et Parmentier [153], une cartouche en papier Whatman est chargée avec 25 g de poudre de *Daphne gnidium* et placée dans un extracteur Soxhlet. Le ballon du montage contient au préalable 200 mL d'hexane. Après plusieurs cycles d'extraction pendant 6h, l'hexane est évaporé sous vide. Le résidu obtenu sous forme d'un extrait huileux représente la matière grasse.



❖ **Saponification :**

1g d'extrait hexanique est saponifié avec 50 mL de solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (2 mol/L) pendant 1 heure sous reflux. A la fin du reflux, le mélange est lavé avec 20 mL d'eau distillée. Les composants de l'insaponifiable sont ensuite extraits trois fois avec 3 fois 20 mL d'éther. Les extraits sont rassemblés et lavés trois fois avec 50 mL d'eau déminéralisée. Le solvant est ensuite éliminé à 35°C sous pression réduite avec un évaporateur rotatif, puis pesé [154].

❖ **Extraction des acides gras**

La solution savonneuse aqueuse obtenue précédemment est acidifiée avec du HCl 1N jusqu'à précipitation des acides gras (pH 5-6). Les acides gras libérés sont extraits à l'éther (3x 20 mL) et séchés sur MgSO<sub>4</sub> puis pesés. Les acides gras sont transformés en leurs dérivés esters méthyliques par l'ajout d'une solution méthanolique de BF<sub>3</sub> à 10% (1mL de BF<sub>3</sub> dans 10 mL d'éthanol). Par la suite, les acides gras sont extraits trois fois avec 50 mL d'hexane à température ambiante. La couche organique est évaporée et séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [154].

Le rendement de l'extraction est le rapport de la quantité de l'extrait recueillie après extraction sur la quantité de la biomasse.

$$R (\%) = [(P_1 - P_2) / P_3] \times 100$$

**P<sub>1</sub>** : Poids du ballon après évaporation

**P<sub>2</sub>** : Poids du ballon vide

**P<sub>3</sub>** : Poids de la matière végétale de départ

## VII. Activités biologiques des plantes

### VII.1. Evaluation de l'activité antioxydante

#### VII.1.1. Test de piégeage du radical libre (DPPH)

Les radicaux du 2, 2-diphényl-1-picryl-hydrazylhydrate sont dissous dans du méthanol généralement à 0,004 % (P/V). L'extrait de plante ou l'antioxydant de référence est mis en contact avec la solution radicalaire de DPPH. Après incubation du mélange, l'absorbance est lue à 515-517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometer, Optizen POP).

50 µL de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH à 0,025 g/L. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µL de méthanol avec 1,95 mL de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après avoir été maintenu dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant

standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons [155].

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%)

$$\% I = \frac{(Abs\ contrôle - Abs\ test)}{Abs\ contrôle} \times 100$$

La IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice à 50%) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés donnant le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des fractions testées.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures.

### VII.1.2. Test de la réduction du fer : Méthode du FRAP

L'activité réductrice du fer des extraits préparés est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu [156] qui est basée sur la réduction du Fe<sup>3+</sup> présent dans le complexe ferrocyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en Fe<sup>2+</sup>. La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) vers la couleur bleu-verte du fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1%. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. 2,5 mL du surnageant sont mélangés à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> à 0,1% fraîchement préparée.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [157].

## VII.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des extraits a été évaluée en utilisant des souches de référence de laboratoire American Type Culture Collection (ATCC) entretenues par des repiquages successifs puis conservées à 4°C sur gélose nutritive.

Le choix des bactéries s'est porté sur deux catégories différentes (Gram positif et Gram négatif).

- ❖ Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- ❖ Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Klebsiella pneumonia* ATCC 70603.

### VII.2.1. Méthode de diffusion sur disque

L'antibiogramme est l'interprétation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en matière d'efficacité chimique. L'activité antibactérienne des extraits a été réalisée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque [158].

Pour la préparation de l'inoculum, chaque culture bactérienne est ensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique. Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre à 625 nm pour une absorbance allant de 0,08 à 0,12. L'équivalent d'une suspension contient environ  $10^7$  UFC/mL.

Les boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton gélosé sont ensemencées par écouvillonnage. Après séchage, un disque stérile de 6 mm de diamètre (Sanofi Diagnostic Pasteur) a été imprégné de 10 µL de l'extrait et placé à la surface de la gélose avec des disques imprégnés de DMSO comme (témoin négatif). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre (en millimètre) des zones d'inhibition de la croissance autour des disques (une zone : test positif, - : test négatif).

La gentamicine (10 µg/disc), la ciprofloxacine (5mcg/disc) et la tobramycine (10 mcg/disc) sont utilisées comme contrôle positif.

### VII.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration d'un produit capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI des extraits est déterminée par la méthode de micro-dilution décrite par le CLSI [158].

La concentration minimale inhibitrice a été calculée par la méthode de microplaque à 96 puits à fond rond. Les extraits ont subi une série de dilution de 1/2 dans un bouillon de Mueller-Hinton (Fluka BioChemika, Espagne), avec 1% de Tween 80 pour avoir une miscibilité totale de l'extrait dans le bouillon.

Une deuxième solution dite blanche a été préparée avec le bouillon Müller-Hinton et le Tween 80 avec une même concentration de 1%. Cette solution a été utilisée pour compléter les dilutions successives de la première solution qui contiennent l'huile essentielle afin que la concentration de Tween 80 reste la même à 1% dans les différentes concentrations préparées.

L'inoculum à  $10^7$  UFC/mL a été dilué au 1/100 pour obtenir une concentration de  $10^5$  UFC/mL. Un volume de 180  $\mu$ L de la suspension bactérienne à  $10^5$  UFC/mL a été déposé à l'intérieur des puits de la microplaque. Ensuite, 20  $\mu$ l de la solution d'extrait a été ajouté. La concentration finale de Tween 80 est de 0,1 % (v/v) dans chaque puits et les concentrations finales allaient de 500 à 0,2  $\mu$ L/mL pour les huiles essentielles et de 25 à 0.01 mg/mL pour les extraits de solvant.

La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24 heures. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait testé pour laquelle aucun trouble visuel n'est observé.

Tous les essais ont été réalisés trois fois.

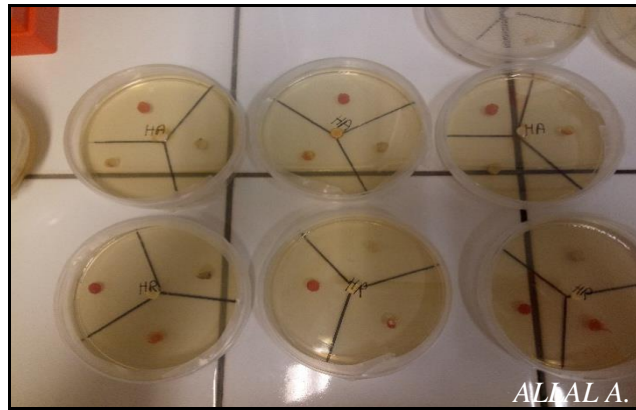
### VII.3. Évaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique des huiles essentielles a été testée contre les souches fongiques *Fusarium graminearum* (Geves MATREF 04-14-02-02), *Zymoseptoria tritici* (CBS 398.52) et *Penicillium expansum* (IP 1350.82). Elles ont été cultivées sur un milieu de gélose de malt agar et incubées à 23°C dans l'obscurité.

#### VII.3.1. Méthode de diffusion

Cette technique a le même principe que celle qu'on a utilisé dans la méthode de disque pour évaluer l'activité antimicrobienne où l'huile essentielle est déposée sur un disque au milieu d'une boîte de Pétri et de part et d'autre, sont déposés les trois champignons (la culture fongique de gélose contient des hyphes découpés à l'emporte pièce), ce qui permet une diffusion de l'HE pour être en contact directe avec les champignons testés.

Après plusieurs jours d'incubation (variable selon la souche) à 23°C, une mesure du diamètre de croissance à l'aide d'un décimètre est effectuée afin d'observer une éventuelle activité (**Figure 12**).



**Figure 12 :** Activité antifongique des huiles essentielles par la méthode de diffusion

### VII.3.2. Méthode de fumigation

L'activité antifongique des huiles essentielles a aussi été évaluée par la méthode de fumigation en fonction de leur capacité à inhiber la croissance mycélienne.

Après 7 jours de culture à 23°C, des bouchons mycéliens de 6 mm de diamètre de chaque souche fongique ont été placés dans une boîte de Pétri. Un disque de cellulose de 6 mm sur lequel est déposé l'huile essentielle à tester, est placé au centre de chaque couvercle de la boîte de Pétri. Un contrôle négatif (disque de cellulose sans huile essentielle) a été réalisé de la même manière. Les boîtes de Pétri étaient alors scellées avec du parafilm et incubées à 23 °C dans l'obscurité.

La croissance radiale mycélienne a été mesurée après 3 à 7 jours d'incubation, et l'index antifongique a été calculé avec la formule suivante :

$$\% \text{ Indice antifongique} = 1 - \left( \frac{Dex}{Dc} \right) \times 100$$

Dex : Diamètre de la zone de croissance dans la plaque expérimentale (mm).

Dc : Diamètre de la zone de croissance dans la plaque de contrôle (mm).

### VIII. Test d'écotoxicologie sur des larves d'Artémis (*Artemia salina*)

- ❖ Mise à éclosion des larves d'Artémis
  - Déposer les larves d'*Artemia salina* lyophilisées dans une boîte de Pétri contenant de l'eau de mer préalablement filtrée.
  - Placer le couvercle recouvert de papier aluminium sur la moitié de la boîte et mettre le tout sous une lampe, pendant 48 heures.
  - Après éclosion, les larves vont se diriger vers la partie éclairée.



**Figure 13 :** Eclosion des larves d'Artemis

❖ Mise en contact avec la substance d'essai

Le test est réalisé dans les microplaques 96 puits. Pour chaque extrait, chacune des concentrations est testée trois fois. Dans chaque puits, ont été déposés 2  $\mu$ L d'extrait et 198  $\mu$ L d'eau de mer contenant 10 crevettes. Des témoins ont été réalisés en déposant 100% d'eau de mer contenant 1% de solvant.



**Figure 14 :** Test d'écotoxicologie sur des larves d'Artemis

Après 24 et 48 heures, on observe avec la loupe binoculaire le nombre de crevettes vivantes en fonction de la concentration de l'extrait.



*Chapitre IV : Résultats et  
discussion*

Notre travail consiste à effectuer une étude phytochimique et évaluer quelques activités biologiques de deux plantes de l'ouest Algérien ; il s'agit de *Daphne gnidium* L. et *Atractylis humilis* L..

## I. Étude ethnobotanique

Selon AGBOGIDI [159], les études ethnobotaniques apparaissent comme une bonne approche pour comprendre dans une région donnée, les utilisations ainsi que les perceptions socioculturelles et économiques des ressources végétales par les populations locales. Les facteurs qui affectent les formes d'utilisation et la valeur accordée aux ressources végétales par les communautés font encore l'objet de discussions dans la littérature scientifique. Les formes d'utilisation pourraient varier selon les ressources exploitées, la région, le sexe et les groupes ethniques [160-161].

Au préalable, un travail de terrain a été entrepris et qui avait pour but de réaliser une enquête ethnobotanique sur deux plantes médicinales de la région de Tlemcen afin d'identifier les utilités thérapeutiques par la population locale et ses habitudes. La prise en compte de ces spécificités à travers la détermination des valeurs d'usage ethnobotanique de ces deux plantes pourrait non seulement aider à définir dans les programmes d'aménagement, les parties qualifiées pour la conservation, mais aussi celles qui contribuent aux bien-être des populations locales. Par ailleurs, cette enquête nous a permis de récolter des informations portant sur la personne ainsi que sur la partie de la plante utilisée et son mode d'emploi.

Les diverses investigations menées ont permis de comprendre, qu'en grande majorité, ce sont les populations rurales qui se soignent avec les plantes en utilisant les recettes proposées par les thérapeutes traditionnels.

### ➤ Sexe d'appartenance

Dans la zone d'étude, les hommes et les femmes sont tous les deux concernés par la médecine traditionnelle. Cependant, les femmes ont un peu plus de connaissances sur les espèces médicinales par rapport aux hommes (60% contre 40%). Ces résultats confirment ceux obtenus par d'autres recherches ethnobotaniques réalisées à l'échelle nationale, qui ont montré que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapeutique traditionnel que les hommes [162].

Sur le terrain d'enquête, si les femmes et les hommes se chargent équitablement de la collecte des plantes médicinales, leur séchage et leur stockage, les préparations des recettes pour les soins des membres de la famille sont souvent effectuées par les femmes. L'homme se réserve la tâche de la collecte des plantes dans les zones réputées dangereuses.

### ➤ Classe d'âge

L'utilisation des plantes médicinales dans la région de Tlemcen est répandue presque chez toutes les tranches d'âge, avec une prédominance chez les personnes les plus âgées ayant plus de 60 ans (41.46%). Cependant, pour la tranche d'âge de 40 à 50 ans, le taux d'utilisation est de 30.33% alors que pour les tranches d'âge allant de 30 à 40 ans et celles de 50 à 60 ans,



les pourcentages de traitement par les plantes sont respectivement de 19% et 6%. Pour les jeunes personnes dont l'âge varie de 20 à 30 ans (2.2%) et celles dont l'âge est inférieur à 20 ans (1%), le recours au traitement par les plantes ne représente pas un grand intérêt thérapeutique.

La connaissance des propriétés et usages des plantes médicinales sont généralement acquises suite à une longue expérience accumulée et transmise d'une génération à l'autre. La transmission de cette connaissance est en danger actuellement parce qu'elle n'est pas toujours assurée. En effet, les résultats obtenus montrent effectivement que les personnes les plus âgées ont plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges et en particulier les jeunes qui, souvent n'ont aucun rapport avec la phytothérapie.

#### ➤ Niveau d'étude

Une bonne partie des usagers des deux plantes médicinales dans la zone d'étude est analphabète, avec un pourcentage relativement élevé de 49%. Par ailleurs, les personnes ayant le niveau de l'école primaire ont un pourcentage d'utilisation non négligeable, alors que celles ayant un niveau d'études secondaires et universitaires, utilisent très peu les plantes médicinales. Il s'avère donc, que le traitement par les plantes est inversement proportionnel au niveau d'étude de la personne.

#### ➤ Mode d'utilisation

L'enquête menée auprès de 80 personnes a permis de mettre en évidence l'usage modéré des différents organes des deux espèces *D. gnidium* et *A. humilis* et de recenser leurs utilisations limitées. Il s'est avéré que toutes les parties de la plante sont utilisées pour traiter diverses pathologies.

Pour *D. gnidium*, souvent, c'est la partie aérienne qui est utilisée par les tradipraticiens en usage externe sous forme de décoction ou de pâte en association avec d'autres plantes, pour le traitement de la sinusite et la rétention d'eau (l'œdème des jambes). Par ailleurs, le fruit est utilisé en cas de rougeole chez l'enfant. Cependant, ces utilisations n'ont jamais été décrites dans la littérature.

D'autre part, les femmes utilisent *D. gnidium* dans les soins capillaires pour le lissage des cheveux et le traitement de leur chute. D'ailleurs, cette pathologie est la plus traitée localement par cette espèce confirmant ce qui a déjà été évoqué par d'autres chercheurs [163].

En ce qui concerne *A. humilis*, les racines décoctées constituent l'organe le plus utilisé pour le traitement des affections gastro-intestinales et les infections urinaires. Sous forme de poudre, les racines servent à traiter le goitre et le diabète ; deux utilisations qui n'ont jamais été citées auparavant. Par ailleurs, les cendres de la partie aérienne mélangées à de l'huile de cade, sont préconisées contre les maladies de la peau, comme l'eczéma et la gale.

## II. L'espèce *Daphne gnidium* L.

### II.1. Rendements des extraits bruts

La préparation des extraits à partir de la partie aérienne de *Daphne gnidium* a été effectuée par deux solvants de polarités différentes ; l'eau et le méthanol.

Les résultats correspondants aux rendements sont consignés dans le **Tableau 2**

**Tableau 2 :** Masse et rendement des extraits de *Daphne gnidium* L.

Materiel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
25g	Aqueux	4.59	18.36 %
	Méthanolique	10.69	42.76%

Il ressort du tableau que le rendement de l'extrait méthanolique est très important et dépasse largement celui de l'extrait aqueux.

### II.2. Criblage phytochimique

La phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques a été réalisée sur des extraits de la partie aérienne de *D. gnidium* L.. En effet, elle nous renseigne sur les principaux métabolites secondaires existants dans l'extrait.

Les résultats de ce criblage phytochimique sont reportés dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 :** Résultat de la phytochimie qualitative de la partie aérienne de *Daphne gnidium* L.

Réactif	Famille	Extrait	
		Aqueux	Ethanolique
Mayer	Alcaloïdes	/	-
Wagner		/	-
Mg, HCl	Flavonoïdes	+	+
Liqueur de Fehling	Composés réducteurs	+	+
FeCl <sub>3</sub>	Tanins	+	+
NH <sub>4</sub> OH 10%	Coumarines	/	-
Réactif d'amidon	Amidon	-	/
Anhydride acétique+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Stéroïdes	/	-
Indice de mousse	Saponosides	+	/

- : absence      + : présence      / : non testé

Au cours de ces tests, deux solvants de polarités différentes (eau, éthanol) ont été utilisés.

Le criblage phytochimique nous a permis de caractériser les principaux groupes chimiques qui pourraient être responsables des propriétés biologiques des extraits aqueux et éthanolique de l'espèce *D. gnidium* L..

Les groupes chimiques mis en évidence sont les flavonoïdes, les composés réducteurs, les tanins, et les saponosides **Tableau 3**. Par ailleurs, les alcaloïdes, les coumarines et les stéroïdes ainsi que l'amidon n'étaient pas présents.

La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec les tournures de magnésium alors que les tanins affichent une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleu verdâtre. La richesse de *D. gnidium* L. en composés phénoliques donnerait à la plante des activités biologiques intéressantes. En effet, les flavonoïdes possèdent un spectre très large d'activités biologiques et pharmacologiques comprenant des activités antitumorales, antioxydantes, anti-inflammatoires.... Comme les flavonoïdes, les tanins sont aussi doués d'activités antifongiques, antibactériennes et antioxydantes. Les tanins sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines [164].

### II.3. Dosage phytochimique des extraits

A la lecture des résultats obtenus et présentés dans le **Tableau 4**, les quantités des polyphénols (12.73 mg GAE/g) et des flavonoïdes (11.95 mg QE/g) sont importantes. Par contre, la quantité des tanins trouvée est très faible, et est de 0.04 mg CE/g.

Il a été rapporté que le taux des tanins dans une plante dépend du stade de développement végétatif de l'espèce et des conditions environnementales [165].

**Tableau 4** : Teneurs en composés phénoliques de la partie aérienne de *Daphne gnidium* L.

<b>Polyphénols (mg GAE/g)</b>	12.73 ± 0.03
<b>Tanins (mg CE/g)</b>	0.04 ± 0.02
<b>Flavonoïdes (mg QE/g)</b>	11.95 ± 0.02

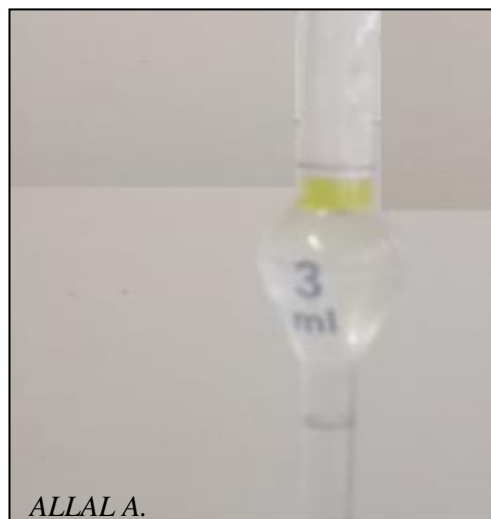
### II.4. Caractérisation chimique de la partie volatile

#### II.4.1. Lieux de récolte et rendement

Le lieu de récolte de la partie aérienne de *D. gnidium* a été cité au chapitre matériel et méthodes (page 34).

L'identification de la plante a été faite par le docteur Baba Ali du laboratoire de botanique de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen

L'huile essentielle a été obtenue à partir de la partie aérienne par hydrodistillation pendant 5 h à l'aide d'un appareil de type Clevenger. L'extraction a produit une huile essentielle de couleur jaune et d'une odeur forte avec un rendement de 0.015 %, calculé par rapport à la masse du végétal frais. D'autre part un extrait d'hydrolat a été obtenu à 0.018%.



**Figure 15** : Huile essentielle de *D. gnidium* L.

#### **II.4.2. Composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *D. gnidium***

L'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat de cette espèce n'ont été jamais étudiés et leurs compositions chimiques restent toujours inconnues. Les deux extraits ont été analysés par CPG et CPG/SM.

Ces analyses ont permis d'identifier cent neuf composés dans l'huile essentielle de *D. gnidium* L.. Les identifications sont établies sur la base des bibliothèques « Arômes » propres au Laboratoire de l'université de Corse et à l'aide des bibliothèques commerciales. Ils représentent 95.5% de la composition chimique totale de l'huile essentielle **Tableau 5**. Les monoterpènes oxygénés (34%) constituent la majorité de la composition de l'huile essentielle suivis des sesquiterpènes oxygénés (23,2%), des composés oxygénés non terpéniques (21.2%) et des sesquiterpènes hydrocarbonés (9,4%). On révèle, en outre, la faible présence des deux classes de monoterpènes hydrocarbonés (0.5%) et de diterpènes oxygénés (0.6%). L'huile essentielle de *D. gnidium* L. est dominée principalement par la carvone (12.7%), le spathulenol (11.2%), et le carvacrol (6.9%) (**Figure 16**). Les autres composés présents en moindre importance sont l'acide hexadécanoïque (5.9%), le E-anéthol (3.8%), le thymol (3,6%), le piperitenone oxide (3,3%).

D'autre part, trente-cinq constituants représentant 81.4% de la composition totale de l'extrait d'hydrolat ont été identifiés et présentés dans le **Tableau 5**. L'extrait est constitué uniquement de composés oxygénés dont les constituants principaux sont des monoterpènes oxygénés (42.1%) dont les deux composés prédominants sont la carvone et le carvacrol (**Figure 16**) à 10.9% chacun, suivis de l'acide hexadécanoïque (6.5%), la cuminaldéhyde

(5.6%) et l'eugénol (4.6%).

**Tableau 5 :** Composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *D. gnidium* L.

N°	Composés <sup>a</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	HE <sup>e</sup> %	HY <sup>e</sup> %
1	3-Methyl-3-pentanol	757	793	-	-	3.6
2	Benzaldehyde	929	929	1530	0.1	-
3	β-Pinene	970	969	1017	tr	-
4	Myrcene	987	979	1158	tr	-
5	P- cymene	1011	1011	1261	0.3	-
6	Benzyl alcohol	1011	1013	1877	-	0.9
7	Limonene	1020	1020	1194	0.2	-
8	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1051	1056	1449	tr	-
9	<i>trans</i> -linaloloxide	1057	1061	1435	0.1	0.4
10	Octanol	1058	1064	1549	tr	-
11	6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	1074	1080	-	-	0.8
12	Nonanal	1083	1081	1381	0.2	0.6
13	Linalol	1081	1084	1545	0.7	2.9
14	Phenylethanol	1086	1098	1906	-	0.6
15	Phenylacetaldehyde	1112	1111	1592	0.3	-
16	Camphor	1123	1122	1503	0.5	Tr
17	Isophorone	1124	1124	1570	0.1	-
18	Cryptone	1157	1158	1662	0.9	-
19	Terpinen-4-ol	1161	1162	1657	0.8	-
20	α-Terpineol	1179	1176	1700	-	2.6
21	Estragol	1176	1178	1678	2.1	0.9
22	Decanal	1185	1184	1498	0.4	0.9
23	<i>trans</i> -Carveol	1200	1197	1820	0.2	-
24	Nerol	1210	1205	1799	0.6	-
25	Cuminaldehyde	1217	1213	1777	0.6	5.6
26	Carvone	1222	1222	1756	12.7	10.9
27	Geraniol	1232	1232	1845	0.1	-
28	E-Myrtenol	1241	1234	1864	0.1	-
29	(E)-2-Decanal	1248	1246	1662	0.2	-
30	Phellandral	1251	1253	1708	0.6	-
31	α-Terpinen-7-ol	1258	1260	1771	0.3	0.6
32	E-anethole	1264	1268	1801	3.8	3.1
33	P- cymen-7-ol	1271	1275	2091	-	1.2
34	Thymol	1266	1278	2167	3.6	1.1
35	Undecan-2-one	1273	1279	1592	0.6	0.8
36	Undecan-2-ol	1284	1281	1711	2.6	-
37	Carvacrol	1278	1288	2219	6.9	10.9

38	Tridecane	1300	1302	1352	0.4	-
39	Piperitenone	1318	1317	1318	-	0.6
40	Eugenol	1330	1324	2164	0.3	4.6
41	Piperitenone oxide	1333	1343	1927	3.3	-
42	Geranyl acetate	1362	1352	1750	0.2	-
43	$\beta$ -Damascenone	1362	1367	1780	0.7	2.9
44	Methyleugenol	1367	1373	2009	0.5	0.6
45	$\alpha$ -Copaene	1379	1376	1520	0.6	-
46	Nepetalactone	1380	1382	1970	2.2	-
47	$\beta$ -Elemene	1389	1387	1565	0.6	-
48	Dodecanal	1395	1398	1707	0.3	-
49	Isocaryophyllene	1409	1401	1558	0.5	-
50	Nerylacetone	1410	1409	1826	0.7	1.4
51	Trans caryophyllene	1424	1420	1609	0.8	-
52	Geranylacetone	1430	1431	1860	0.6	-
53	(E)- $\beta$ -farnesene	1446	1445	1651	0.3	-
54	Aromadendrene	1451	1448	1626	0.4	-
55	Allo-aromadendrene	1462	1456	1631	0.7	-
56	Damascone	1466	1460	1809	0.2	-
57	$\alpha$ -Curcumene	1471	1472	1772	2.1	-
58	$\gamma$ -Curcumene	1474	1476	1685	0.2	-
59	$\beta$ -Ionone	1476	1478	1936	-	2.9
60	D-Germacrene	1479	1480	1646	0.4	-
61	$\beta$ -Selinene	1483	1485	1724	0.2	-
62	Tridecanal	1494	1493	1819	1.3	-
63	Dihydroactinidiolide	1479	1499	-	-	2.8
64	$\beta$ -Bisabolene	1500	1509	1725	0.4	-
65	$\alpha$ -Bisabolene	1518	1514	1767	0.5	-
66	$\delta$ -Cadinene	1516	1516	1774	0.2	-
67	$\alpha$ -Cadinene	1535	1528	1777	0.3	-
68	Calamenene	1534	1539	1823	1.2	-
69	Nerolidol	1546	1544	2045	0.4	-
70	$\alpha$ -Copaen-11-ol	1547	1552	2104	0.2	-
71	<i>cis</i> -3-hexenyl benzoate	1554	1554	2088	0.4	2.4
72	Spathulenol	1568	1570	2093	11.2	0.7
73	Caryophyllene oxide	1576	1580	1981	0.7	2.2
74	Globulol	1580	1582	2066	0.3	-
75	Viridiflorol	1591	1589	2085	0.4	-
76	Humulene epoxide II	1601	1594	2034	0.6	-
77	Tetradecanal	1592	1598	1927	0.9	-
78	Cubenol	1611	1611	2074	tr	-
79	Aromadendrene oxide II	1617	1617	1997	0.1	tr
80	Epicubenol	1624	1624	2060	0.4	-

81	Isospathulenol	1625	1625	2134	0.6	-
82	$\tau$ -Cadinol	1632	1628	2157	0.5	-
83	Ar-turmerone	1639	1641	2266	2.4	1.4
84	$\beta$ -Eudesmol	1644	1645	2241	0.6	-
85	$\alpha$ -Cadinol	1645	1650	2236	0.6	-
86	$\alpha$ -Eudesmol	1653	1654	2227	0.2	-
87	(Z,Z)Farnesal	1655	1663	2163	0.7	-
88	2-Oplopenol	1670	1668	2283	0.2	-
89	$\alpha$ -Bisabolol	1673	1674	2206	0.3	tr
90	(Z,E)Farnesol	1687	1687	2307	0.2	-
91	Heptadecane	1700	1707	1698	0.2	-
92	Benzyl benzoate	1733	1739	2593	-	1.8
93	Tetradecanoic acid	1748	1739	2658	0.4	-
94	Hexadecanal	1795	1796	2139	0.2	-
95	Phytone	1817	1821	2142	1.6	2.2
96	(Z,Z)-Farnesylacetone	1844	1841	2277	0.3	-
97	Pentadecanoic acid	1848	1847	2787	0.1	-
98	(E,E)-farnesylacetone	1895	1892	2366	0.7	-
99	Hexadecanoic acid	1968	1964	2867	5.9	6.5
100	Octadecanal	1995	1990	2349	0.3	-
101	Geranylinalool	2010	1999	2533	0.2	-
102	Octadecanol	2070	2061	2591	0.2	-
103	Octadecanoic acid	2103	2105	2607	0.3	-
104	Phytol	2104	2116	2645	0.4	-
105	Dicosane	2200	2195	2188	0.3	-
106	Tricosane	2300	2296	2317	0.6	-
107	Tetracosane	2400	2395	2397	0.4	-
108	Pentacosane	2500	2499	2495	1.3	-
109	Octacosane	2600	2595	-	0.5	-
	Total identification %				95.5	81.4
	Composés hydrocarbonés				13.6	-
	Monoterpènes hydrocarbonés				0.5	-
	Sesquiterpènes hydrocarbonés				9.4	-
	Hydrocarbonés non terpénique				3.7	-
	Composés oxygenés				81.9	81.4
	Monoterpènes oxygenés				34.0	42.1
	sesquiterpènes oxygenés				23.2	6.5
	Diterpènes oxygenés				0.6	-
	Oxygenés non terpéniques				21.2	26.7
	Phényl propanoïdes				2.9	6.1

<sup>a</sup> L'ordre d'éluéon donné sur colonne apolaire (Rtx-1)

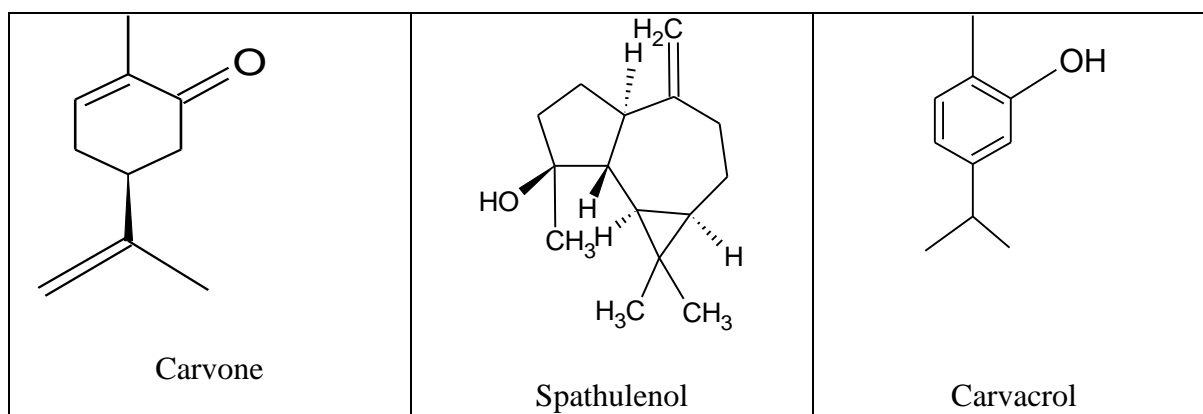
<sup>b</sup> Indices de rétéon sur colonne apolaire issus de la littérature [166]

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

<sup>d</sup> Indices de rétéon sur colonne polaire Rtx-wax

<sup>e</sup> Huile essentielle extrait d'Hydrolat

RI : indices de rétéon, HE : huile essentielle, HY : hydrolat.



**Figure 16 :** Structures chimiques des principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat de *D. gnidium* L.

## II.5. Composition en acides gras de *D. gnidium*

L'idée consiste à extraire et à mettre en évidence le profil chimique des acides gras présents dans la plante. A cet effet, l'analyse de l'extrait a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

Les résultats obtenus sont consignés dans le **Tableau 6**.



**Tableau 6** : Composition en acides gras de la partie aérienne de *Daphne gnidium* L.

N°	Composé acide	RIa <sup>b</sup>	Ria <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	%
1	Myristique (Tétradécanoïque) (C14:0)	1708	1722	2000	1.3
2	Pentadécanoïque (C15:0)	1810	1822	2121	0.5
3	Cis-9-Hexadécanoïque(C16:1)	1897	1899	2254	1.5
4	Palmitique(Hexadécanoïque) (C16:0)	1928	1933	2240	30.0
5	Cis-10-Heptadécanoïque (C18:1)	2009	1998	2330	0.3
6	Heptadecanoic acid (C18:0)	2011	2026	2350	0.5
7	Linoléique (C18:2)	2083	2099	2506	24.3
8	Oléique (C18:1)	2098	2109	2465	14.6
9	(Z)-9-Octadécanoïque (C18:1)	2109	2104	2437	11.2
10	Stéarique (C18:0)	2128	2131	2445	2.6
11	11-Eicosénoïque (C21:1)	2248	2237		0.3
12	Arachidique (C20:0)	2318	2301	2646	0.8
13	Arachidonique (5,8,11,14-eicosatétraénoïque) (C20:4)	2311	2331	2651	2.6
	Total identifié %				90.5
	Acides gras saturés				35.7
	Acides gras monoinsaturés				27.9
	Acides gras polyinsaturés				26.9

<sup>a</sup> L'ordre d'éluion de la colonne apolaire (Rtx-1). <sup>b</sup> Indice de rétention de la littérature des esters correspondants sur la colonne apolaire (I) (Jennings and Shibamoto. 1980; König and *al.*. 2001). <sup>c</sup> Indice de rétention de la colonne apolaire Rtx-1 (I<sub>a</sub>). <sup>d</sup> Pourcentages relative (%) de la colonne apolaire (Rtx-1); tr = trace(<0.1%).

Le rendement de l'extrait hexanique de *D. gnidium* L. est de 11.28%, et le rendement en acides gras de la partie aérienne est de 1.80% alors que celui de la fraction insaponifiable est de 0.20%.

A la lecture du **Tableau 6**, treize acides gras ont pu être identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux d'un mélange étalon d'esters méthyliques avec un total d'identification de 90.5%.

L'analyse montre aussi que l'acide palmitique (C16 :0), l'acide linoléique (C18 :2) et l'acide oléique (C18 :1) sont prépondérants avec des teneurs respectives de l'ordre de 30%, 24% et 14.6%. Largement présent dans l'industrie alimentaire, le premier acide est connu pour ses bienfaits pour notre santé [167].

Quant à l'acide linoléique et oléique, il s'agit des deux acides gras insaturés les plus importants. En effet, si l'acide linoléique est appelé acide gras essentiel indispensable à la croissance et à l'activité physiologique de tous les tissus, l'acide oléique contribuerait à la diminution du risque de maladies cardiovasculaires [168-169].

## II.6. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle, de l'extrait d'hydrolat et des différents extraits de *D. gnidium* L.

### II.6.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517 nm. Une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydante.

Dans notre travail, nous avons testé les activités de l'huile essentielle, l'extrait d'hydrolat, les extraits méthanolique et aqueux de la partie aérienne de *D gnidium* L.

Les données relatives à l'activité antioxydante de nos extraits, exprimée en IC<sub>50</sub> (mg/mL), sont présentées dans le **Tableau 7**.

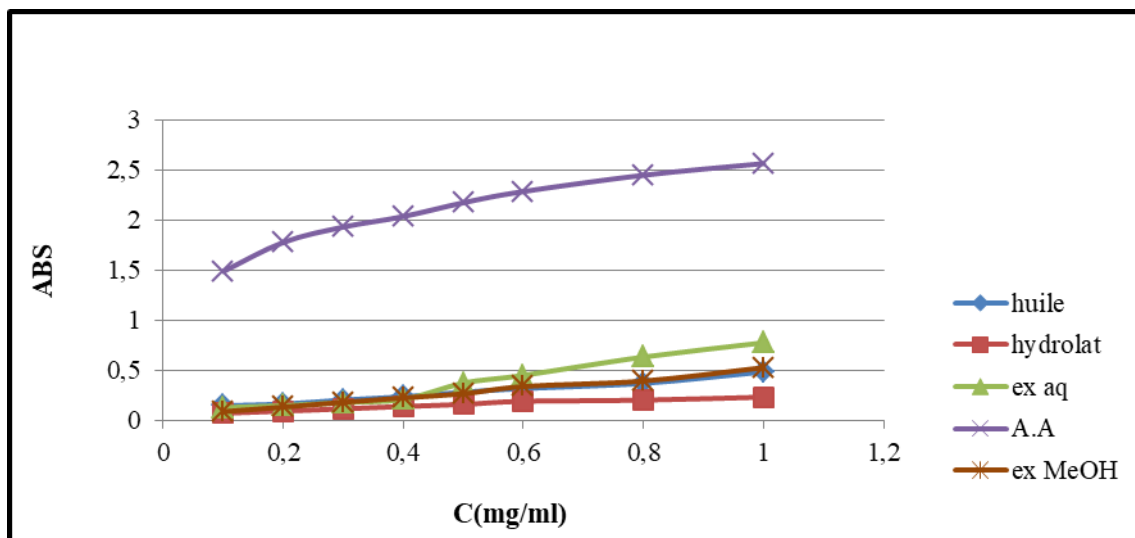
Les tests ont montré que les extraits aqueux et méthanolique ont la capacité de réduire le radical DPPH· à 80% lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations faibles de l'ordre de 0.17 et 0.19 mg/mL respectivement. Les valeurs des IC<sub>50</sub> correspondantes sont les plus faibles et sont de 0.10 et 0.12 mg/mL respectivement. Quant aux deux autres extraits, c'est l'hydrolat avec une IC<sub>50</sub> de 0.62 mg/mL qui présente la meilleure activité antiradicalaire par rapport à l'huile essentielle dont la IC<sub>50</sub> est de 1.14 mg/mL. Les deux activités restent quand-même légèrement inférieures à celle de l'acide ascorbique pris comme témoin.

**Tableau 7** : Concentrations IC<sub>50</sub> des extraits de *D. gnidium* par la méthode DPPH.

	L'extrait aqueux	L'extrait méthanolique	L'huile essentielle	L'extrait d'hydrolat	Acide ascorbique
IC <sub>50</sub> (mg/mL)	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.10	1.14 ± 0.15	0.62 ± 0.09	0.06 ± 0.02

### II.6.2. Test de la réduction du fer (Méthode FRAP)

La présence des réducteurs dans les extraits de plantes provoque la réduction de Fe<sup>3+</sup>/complexe ferricyanide vers la forme du fer ferreux. Par conséquent, Fe<sup>2+</sup> peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm [170].



**Figure 17 :** Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP de l'espèce *D. gnidium*

Il ressort du graphique que tous les extraits présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celle de la référence (acide ascorbique). Il apparaît aussi que c'est l'extrait aqueux qui présente le meilleur pouvoir antioxydant suivi de l'extrait méthanolique, alors que les activités les plus faibles ont été trouvées chez l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat.

L'activité antioxydante était liée à la classe de composés présents à la fois dans l'huile essentielle et dans l'extrait d'hydrolat qui sont dominés par les monoterpènes oxygénés (36,9 % et 48,2 %, respectivement). Il a été rapporté que les monoterpènes et les sesquiterpènes possèdent des propriétés antioxydantes [171]. En effet, la carvone présentait une activité antioxydante efficace et puissante [172]. Cependant, en tant que mélange polaire, l'extrait d'hydrolat présente une teneur élevée en composés uniquement oxygénés (81,4%). Il est bien connu que les alcools et les composants phénoliques avec une capacité élevée de donneur d'hydrogène vis-à-vis du radical DPPH présentaient des propriétés antioxydantes significatives [173-175]. En effet, il a été montré que le carvacrol présentait un fort potentiel antioxydant en raison de la présence d'un groupe hydroxyle lié au cycle aromatique de la molécule de carvacrol [176]. De plus, l'activité antioxydante des huiles essentielles ou/et de l'extrait d'hydrolat peut être liée à tous les composés. Par conséquent, des études de synergie et d'antagonisme doivent être développées [177].

## II.7. Évaluation de l'activité antibactérienne

### II.7.1. Méthode de diffusion des disques sur milieu solide

L'étude de l'activité antibactérienne, sur sept souches de référence, a été réalisée par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide (Mueller Hinton). Il s'agit d'un test qualitatif permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une

substance réputée antimicrobienne. Il est basé sur la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque imprégné d'extrait de plante.

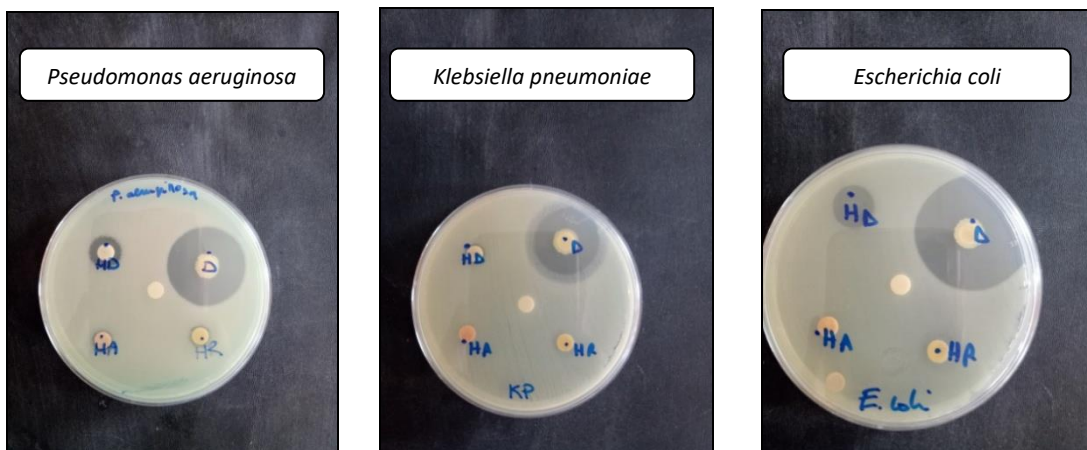
La gentamicine, la ciprofloxacine et la tobramycine ont été utilisées comme des molécules de référence.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis des bactéries sont représentés dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8** : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des extraits de *D. gnidium*

	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
	Extrait				Antibiotiques standard		
	HE	HY	E.aqueux	E.méthanolique	Gent	CIP	TOB
<b>Bactérie Gram +</b>							
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 ± 00	11 ± 00	-	7 ± 0.03	16	30	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	14 ± 0.01	9 ± 0.02	-	-	-	14	-
<i>Bacillus cereus</i>	27 ± 0.06	11 ± 00	7 ± 0.01	11 ± 00	24	27	12
<i>Bacillus subtilis</i>	28 ± 00	14 ± 0.01	11 ± 0.01	7 ± 0.03	-	25	16
<b>Bactérie Gram -</b>							
<i>Escherichia coli</i>	36 ± 0.01	13 ± 00	-	9 ± 0.02	21	33	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31 ± 00	12 ± 0.01	9 ± 00	8 ± 0.01	19	33	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25 ± 0.02	8 ± 0.02	7 ± 0.01	-	21	28	15

- : test négatif ; Gent : Gentamicine ; CIP : Ciprofloxacine ; TO : Tobramycine



**Figure 18** : Exemples de zones d'inhibition les plus importantes des extraits de *D. gnidium*

Les résultats obtenus ont montré que les extraits étudiés ont contribué à l'inhibition de toutes les souches testées à divers degrés. L'huile essentielle a une activité antibactériennes très intéressante contre les bactéries testées tandis que l'extrait d'hydrolat a montré une activité modérée. L'huile essentielle s'est avérée avoir des activités antimicrobiennes contre les bactéries Gram-positives et Gram négatives. En effet, en présence de l'HE, *E. coli* comme

bactérie d'origine alimentaire [178], *P. aeruginosa* et *S aureus* deux pathogènes responsables d'un certain nombre d'infections nosocomiales [179], étaient les micro-organismes les plus sensibles avec des diamètres d'inhibition importants de 36, 31 et 30 mm respectivement.ès sensibles à cette huile avec des zones d'inhibition de 30, 31 et 36 mm respectivement **Tableau 8.**

Cependant, l'effet de HE a été légèrement moins prononcé contre *B.subtilis* (28 mm), *B. cereus* (27 mm) et *K. pneumoniae* (25 mm) tandis que *E. Feacalis* reste la bactérie la plus résistante, en comparaison avec les autres souches, avec un diamètre d'inhibition de 14 mm.

Par ailleurs, les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont toutes les deux sensibles à l'extrait d'hydrolat.

L'extrait aqueux présente une faible capacité d'inhiber la croissance des bactéries : *Bacillus cereus* et *Klebsiella pneumoniae* (7 mm), *Bacillus subtilis* (11 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm). Cependant, aucun effet n'a été obtenu avec les souches : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus feacalis* et *Escherichia coli*.

De plus, l'extrait méthanolique possède une certaine sensibilité avec des diamètres d'inhibition qui varient de 7 à 11 mm.

Les sensibilités des souches aux antibiotiques de référence ont aussi été testées et les valeurs des diamètres d'inhibition sont comprises entre 12 et 33 mm.

### II.7.2. Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de l'extrait qui est capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI des extraits de la partie aérienne de *Daphne gnidium* vis-à-vis des bactéries est déterminée par la méthode de micro dilution en milieu liquide en utilisant des microplaques à 96 puits.

Les valeurs de CMI sont reportées dans le **Tableau 9.**

Les valeurs des CMI de l'H.E contre les trois bactéries *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* étaient inférieures à 0,24 µL/mL. L'huile essentielle était plus efficace contre toutes les souches testées que la gentamicine et la tobramycine, mais similaire à la ciprofloxacine utilisée comme antibiotique conventionnel.

En raison de la complexité de la composition chimique de l'H.E, il devient difficile de relier son activité antimicrobienne à un composant spécifique. La classe de composés la plus abondante dans les huiles essentielles sont les terpènes qui sont connus pour être actifs contre un large éventail de micro-organismes [180]. Cependant, plusieurs études ont rapporté que les principaux composés sont souvent responsables de l'activité existante. Nos résultats peuvent être expliqués par l'apparition de plusieurs composants bioactifs rapportés dans la littérature comme la carvone qui est capable d'inhiber la croissance des bactéries [181].

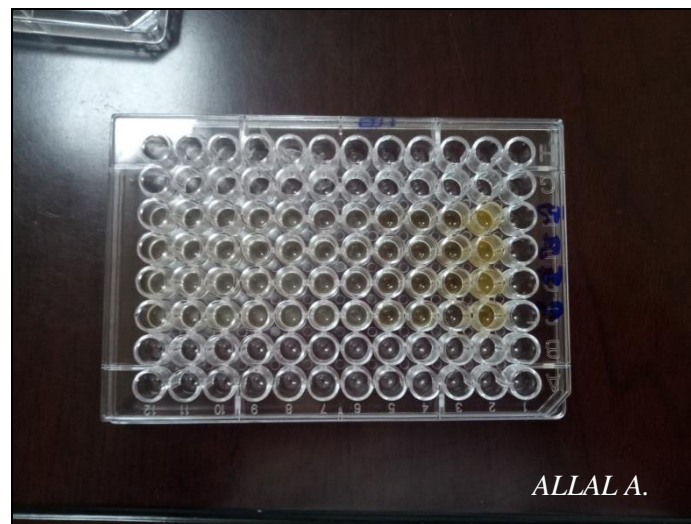
En outre, il a été démontré que l'H.E contenant du spathuléol en tant que composé majoritaire présentait des activités antimicrobiennes contre une variété de bactéries [182]. Sinon, il a également été évoqué que l'activité antimicrobienne peut ne pas reposer exclusivement sur les principaux composés, mais qu'elle est due à un possible effet synergique entre les différents constituants de l'huile essentielle [183].

Quant aux extraits aqueux et méthanolique, ils se sont montrés moins actifs avec des CMI qui varient entre 0.78 et 6.25 mg/mL **Tableau 9**.

**Tableau 9** : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits de *D. gnidium*

	CMI (µL/mL)		CMI (mg/mL)	
	HE	HY	E.aqueux	E.méthanolique
<b>Bactérie Gram +</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 0.24	31.25 ± 0.02	-	3.125 ± 0.03
<i>Enterococcus faecalis</i>	3.90 ± 0.01	62.50 ± 0.01	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	0.97 ± 0.01	15.62 ± 0.03	3.125 ± 0.04	0.78 ± 0.03
<i>Bacillus subtilis</i>	0.48 ± 00	3.90 ± 00	3.125 ± 0.02	6.25 ± 0.01
<b>Bactérie Gram -</b>				
<i>Escherichia coli</i>	< 0.24	7.81 ± 0.01	-	3.125 ± 00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 0.24	7.81 ± 0.01	6.25 ± 0.03	1.56 ± 0.01
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.95 ± 00	15.62 ± 00	0.78 ± 0.01	-

-Test négatif



**Figure19** : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide de l'espèce *D. gnidium*

## II.8. Activité d'écotoxicologie sur les larves d'Artémis

La technique appliquée a été mise à profit pour étudier la toxicité de l'huile essentielle, les extraits aqueux et méthanolique de *D. gnidium*. Le nombre de larves survivantes est compté dans chaque puits et la mortalité est calculée pour chaque concentration après 24 et 48 heures **Tableau 10**.

**Tableau 10 :** Taux de mortalité des larves d'Artémis sous l'effet des différents extraits de *Daphne gnidium*

	Individus morts/10																	
	Après 24 heures									Après 48 heures								
	0			0.1			0.4			0			0.1			0.4		
Témoin	0			0			0			0			0			0		
Concentration (mg/mL)	0.05			0.1			0.4			0.05			0.1			0.4		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Extrait méthanolique	0	0	0	1	0	1	6	5	5	10	9	10	10	10	10	10	10	10
Extrait aqueux	0	0	0	0	0	0	2	3	3	0	0	0	2	3	2	8	7	7
Huile essentielle	10	10	10	10	10	10	/	/	/	10	10	10	10	10	10	/	/	/

L'interprétation des résultats présentés dans le **Tableau 10** s'est basée sur les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) et la réglementation UE (Union Européenne) qui traitent de l'écotoxicité sur l'organisme aquatique. Dans les crustacés, on parle généralement de daphnies qui peuvent être utilisées comme indicateur [184].

Les résultats obtenus après 48 heures montrent pour l'extrait aqueux une DL<sub>50</sub> comprise entre 0.1 et 0.4 mg/mL, soit entre 100 et 400 mg/L. Ces valeurs appartiennent à des concentrations de la catégorie R52 qui est considérée comme non toxique.

Pour les autres extraits aux concentrations testées, il est plus difficile de conclure sur la valeur de la DL<sub>50</sub> car un taux de mortalité de 100% a été atteint. En effet, des concentrations moins élevées doivent être proscrites afin de déterminer les DL<sub>50</sub> de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique. Toutefois, ces deux extraits s'avèrent plus toxiques que l'extrait aqueux.

### III. L'espèce *Atractylis humilis*

#### III.1. Rendements des extraits bruts

La préparation des extraits bruts aqueux et méthanolique à partir de la partie aérienne et de la racine de *Atractylis humilis* ont permis de calculer le rendement de chaque extrait par rapport à la matière végétale sèche.

Les résultats exprimés en pourcentage obtenus sont illustrés dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11** : Masse et rendement des extraits de *Atractylis humilis*.

	Matériel végétal	Extrait	masse (g)	Rendement (%)
Partie aérienne	25 g	Aqueux	0.80	3.21%
		Méthanolique	1.12	4.50%
Racine		Aqueux	2.05	8.20%
		Méthanolique	0.95	3.84%

Le rendement en extrait aqueux de la racine est le plus élevé avec (8.20%), alors que celui obtenu à partir de la partie aérienne est le plus faible (3.21%). Cependant, le rendement en extrait méthanolique de la partie aérienne (4.50%) est plus élevé que celui de la racine (3.84%).

### III.2. Criblage phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur la partie aérienne et la racine de *Atractylis humilis*, de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique sont résumés dans les **Tableaux 12 et 13**.

**Tableau 12** : Résultat de la phytochimie qualitative de la partie aérienne de *Atractylis humilis*

Réactif	Famille	Extrait	
		Aqueux	Ethanolique
Mayer	Alcaloïdes	/	+
Wagner		/	+
Mg, HCl	Flavonoïdes	+	+
Liqueur de Fehling	Composés réducteurs	+	+
FeCl <sub>3</sub>	Tanins	+	+
NH <sub>4</sub> OH 10%	Coumarines	/	-
Réactif d'amidon	Amidon	-	/
Anhydride acétique+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Stérols et Stéroïdes	/	+
Indice de mousse	Saponosides	-	/

- : absence      + : présence      / : non testé

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires dans la plante étudiée par de simples réactions de coloration et de précipitation ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Effectivement, les groupes de composés bioactifs identifiés dans les deux extraits de la plante sont les alcaloïdes, les flavonoïdes, les composés réducteurs, les tanins, les stérols et les



stéroïdes alors que les coumarines, l'amidon et les saponosides sont totalement absents dans les deux extraits de la partie aérienne de la plante.

**Tableau 13** : Résultat de la phytochimie qualitative de la racine de *Atractylis humilis*

Réactif	Famille	Extrait	
		Aqueux	Ethanolique
Mayer	Alcaloïdes	/	+
Wagner		/	+
Mg, HCl	Flavonoïdes	+	+
Liqueur de Fehling	Composés réducteurs	+	+
FeCl <sub>3</sub>	Tanins	+	+
NH <sub>4</sub> OH 10%	Coumarines	/	+
Réactif d'amidon	Amidon	-	/
Anhydride acétique+H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Stérol et Stéroïdes	/	-
Indice de mousse	Saponosides	+	/

- : absence      + : présence      / : non testé

L'analyse de ces résultats expérimentaux nous conduit aux conclusions suivantes :

Les coumarines, les saponosides sont présents uniquement dans la racine de la plante. Dans les deux parties de la plante (aérienne et racine), la recherche des alcaloïdes, des flavonoïdes et des composés réducteurs ainsi que des tanins s'est montrée positive. Le test des flavonoïdes a révélé une forte présence beaucoup plus dans les racines que dans la partie aérienne. Par ailleurs, la présence des alcaloïdes est plus importante dans la partie aérienne que dans les racines. Cependant, l'amidon est totalement absent dans les deux parties de la plante.

### III.3. Dosage phytochimique des extraits

Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche alors que les flavonoïdes et les tanins en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche.

Les résultats obtenus et reportés dans le **Tableau 14**, ont été déterminés à partir des équations de la régression linéaire de chacune des courbes d'étalonnage présentées dans les **Annexes 2, 3 et 4**.

**Tableau 14** : Teneurs en composés phénoliques de *Atractylis humilis*

Partie	Extrait	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tanins
		mg EAG.g <sup>-1</sup>	mg EC.g <sup>-1</sup>	mg EC.g <sup>-1</sup>
Aérienne	Aqueux	3.84 ± 0.03	0.76 ± 0.01	6.03 ± 0.07
	Méthanolique	4.50 ± 0.01	2.60 ± 0.02	4.24 ± 0.01
Racine	Aqueux	17.34 ± 0.05	5.47 ± 0.03	1.60 ± 0.06
	Méthanolique	9.00 ± 0.03	3.60 ± 0.01	9.73 ± 0.01

Les résultats indiquent que l'extrait aqueux des racines possède les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux ( $17.34 \pm 0.05$ ) et en flavonoïdes ( $5.47 \pm 0.03$ ) par rapport à celles de la partie aérienne avec des teneurs respectives de  $3.84 \pm 0.03$  et  $0.76 \pm 0.01$ . Pour l'extrait méthanolique, les polyphénols totaux ( $9.00 \pm 0.03$ ), les flavonoïdes ( $3.6 \pm 0.01$ ) et les tanins ( $9.73 \pm 0.01$ ) sont plus présents dans les racines que dans la partie aérienne.

En ce qui concerne les tanins, la teneur la plus élevée s'avère dans l'extrait méthanolique des racines et l'extrait aqueux de la partie aérienne ( $6.03 \pm 0.07$ ) alors que la teneur la plus faible est constatée dans l'extrait aqueux des racines ( $1.60 \pm 0.06$ ).

### III.4. Caractérisation chimique de la partie volatile

#### III.4.1. Lieux de récolte et rendements

Les matières végétales (racine, partie aérienne) de *Atractylis humilis* ont été récoltées durant le mois de Septembre 2018 en période de floraison à partir de huit stations différentes de la région de Tlemcen où la plante pousse en abondance. L'hydrodistillation au moyen d'un appareillage de type Clevenger a duré 5 heures selon la pharmacopée européenne [185]. Les huiles essentielles d'un aspect visqueux et de couleur rouge pour la partie aérienne et jaune fluide pour les racines ont été séchées sur du sulfate de sodium anhydre. Les rendements d'extractions sont calculés par rapport à la masse du matériel végétal sec. Les HE ont été conservées dans des flacons ambrés, bien scellés, à 4°C pour des utilisations ultérieures.

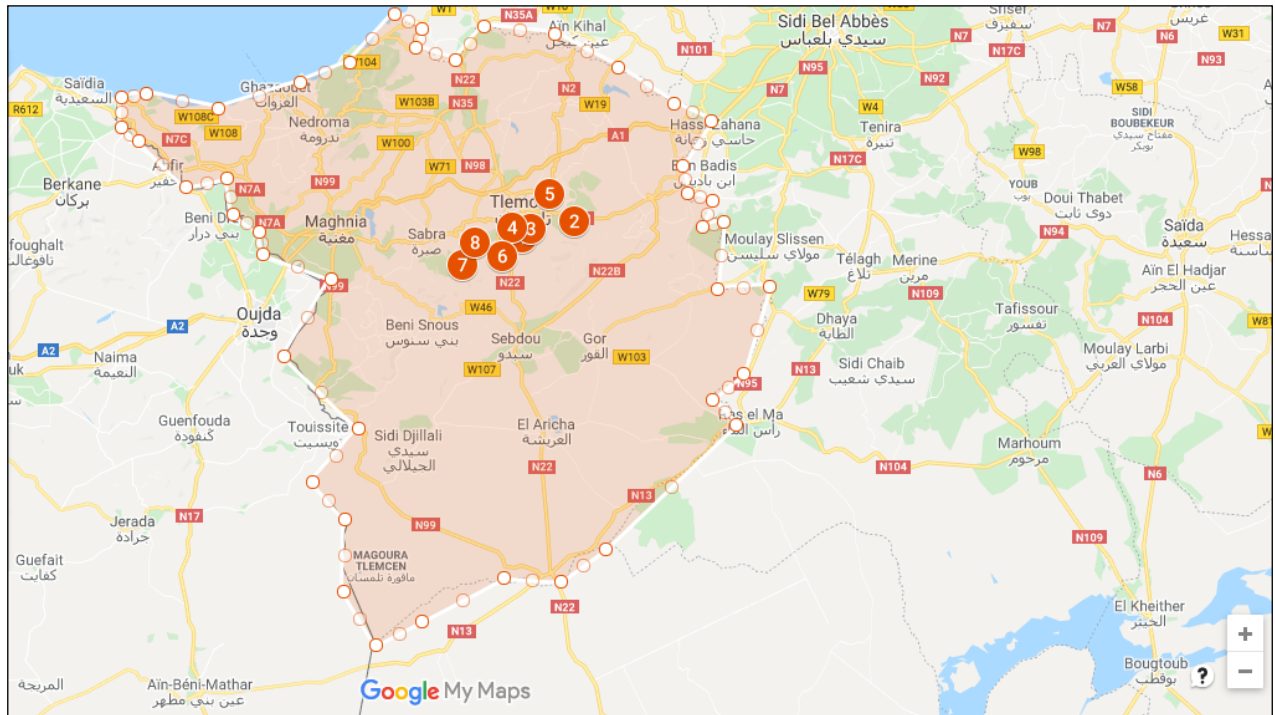
Les coordonnées géographiques concernant les habitats des échantillons ainsi que les rendements en huile essentielle sont présentés dans le **Tableau 15**.

En général, les échantillons provenant des stations situées à haute altitude (S1-S4, S6-S8) présentent des rendements en HE légèrement supérieurs à ceux des basses altitudes S5.

Pour la partie aérienne, les HE ont un rendement moyen, compris entre 0,001 et 0,010% où la région de Zelboun a affiché le rendement le plus élevé. Pour les HE de la racine, les rendements sont majoritairement bien supérieurs à ceux de la partie aérienne et varient de 0,010 à 0,070%.

**Tableau 15 :** Lieux de récoltes, répartition géographique et rendements en huiles essentielles des huit échantillons de *A. humilis*

Echatillon	localité	Coordonnées GPS	Altitudes(m)	Rendements en huile essentielle %	
				Aérienne	Racine
S1	Ouled ouadfel	34°49'57.28"N; 1°19'12.03"O	1128	0.006	0.02
S2	Ain fezza	34°51'44.98"N; 1°12'2.59"O	1029	0.003	0.02
S3	Mafrouch	34°50'49.87"N ; 1°17'53.73"O	1109	0.004	0.02
S4	Harrachi	34°49'54.43"N ; 1°21'49.90"O	1189	0.005	0.07
S5	Sidi aissa	34°54'24.82"N; 1°15'10.32"O	812	0.001	0.01
S6	Terni	34°47'35.25"N ; 1°21'38.34"O	1210	0.004	0.03
S7	khenous	34°47'47.03"N ; 1°26'25.75"O	1228	0.006	0.03
S8	Zalboun	34°51'30.06"N ; 1°25'1.17"O	914	0.01	0.04



**Figure 20 :** Spécimens de *A. humilis* récoltés dans la wilaya de Tlemcen

### III.4.2. Compositions chimiques des huiles essentielles de *Atractylis humilis*

L'analyse préliminaire du profil chimique des HE de chaque partie de la plante montre, en général, une grande similitude qualitative entre tous les échantillons avec une légère différence dans les quantités de leurs composés (**Tableau 16**).

En comparant les deux parties de la plante, mis à part les trois composés courants qui sont le  $\beta$ -élémane, le  $\beta$ -sélinène et le (E)-phytol, la composition chimique des HE de la racine est complètement différente de celle de la partie aérienne. Un total de 15 composés a été identifié dans la partie aérienne et 14 composés dans les HE de la racine représentant respectivement (81,4-92,5%) et (89,5-98,1%) de la composition totale des huiles.

Les HE de la partie aérienne ont été caractérisées par la phytone (11,3-36,1%), le cembrène (2,6-28,6%) et l'acide hexadécanoïque (7,4-13,0%) comme composés principaux.

Les principaux composés dans les HE de la racine étaient le  $\beta$ -élémane (27-33,6%), l' $\alpha$ -sélinène (18,7-24,2%), le  $\beta$ -sélinène (10,3-13,9%) et l'oxyde de ledène (7,4-12,9%).

Les HE de la partie aérienne ont montré une teneur élevée en composés non terpéniques suivis de sesquiterpènes tandis que les HE des racines étaient dominées par des composés sesquiterpéniques comme le  $\beta$ -élémane qui a un potentiel thérapeutique contre les cellules tumorales [186] et pour le traitement des troubles inflammatoires [187] justifiant ainsi, les utilisations traditionnelles de *A. humilis*.

Les structures chimiques des principaux composés des HE de la partie aérienne et des racines sont représentées dans les (**Figures 21 et 22**).

Afin d'effectuer les activités biologiques qui suivent, tous les échantillons des huiles essentielles après analyse, ont été regroupés pour produire une huile essentielle collective « COL ».

			Huile essentielle <i>Atractylis humilis</i> <sup>c</sup>																	
			Partie aérienne									Racine								
N <sup>o</sup>	Composés <sup>a</sup>	RIap <sup>b</sup>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	COL <sup>d</sup>	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	COL <sup>e</sup>
1	Octanol	1017										1.1	1.9	1.6	1.3	1.2	1.3	1.8	1.6	1.1
2	Acétate de linalyle	1270										3.1	3.5	3.9	3.8	3.1	3.1	3.5	2.6	0.9
3	β-élémane	1390	1.5	6.4	8.1	1.7	5.9	5.2	1.5	-	1.4	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>29.7</b>	<b>28.0</b>	<b>27.9</b>	<b>32.1</b>	<b>27</b>	<b>33.6</b>	<b>34.1</b>
4	Isocaryophyllene	1413	9.4	2.9	3.2	8.9	1.8	5.0	9.5	7.0	8.5									
5	α-sélinène	1478										<b>19.7</b>	<b>19.5</b>	<b>19</b>	<b>18.7</b>	<b>22.8</b>	<b>18.7</b>	<b>22.6</b>	<b>24.2</b>	<b>22.8</b>
6	Germarène D	1480										1.2	1.8	1.4	1.5	2.0	-	2.1	-	
7	Valencène	1484										3.6	4.4	3.6	3.6	4.6	1.2	4.4	2.6	4.6
8	β-sélinène	1487	0.6	0.9	0.2	0.6	-	0.8	1.5	5.2	tr	<b>10.9</b>	<b>11.4</b>	<b>12.7</b>	<b>11.9</b>	<b>10.3</b>	<b>13.6</b>	<b>13.9</b>	<b>10.8</b>	<b>14.3</b>
9	Zingibérène	1500	0.6	1.9	2.3	0.7	1.5	1.9	0.7	0.3	0.9									
10	Spathulénol	1558	4.7	2.1	0.9	4.7	tr	-	2.3	4.4	4.8									
11	Oxyde de caryophyllène	1579	1.5	6.4	8.1	1.7	5.9	5.0	1.5	-	1.8									
12	α-Humulène	1579	1.8	9.6	12	2.2	8.2	6.6	2.2	0.5	6.1									
13	Globulol	1584	1.1	4.7	4.4	1.5	3.2	3.5	0.6	-	0.9									
14	Epoxide d'humulène	1604										3.2	4.6	3.7	3.4	4.2	3.3	3.3	2.3	3.1
15	Intermedeol	1616										4.9	2.4	2.2	1.9	tr	2.9	2.3	1.9	1.8
16	Oxyde de ledene	1633										<b>12.9</b>	<b>8.4</b>	<b>10.1</b>	<b>8.1</b>	<b>9.3</b>	<b>10.4</b>	<b>7.4</b>	<b>10.9</b>	<b>12.2</b>
17	α-Cadinol	1652	0.5	-	tr	0.6	-	0.5	1.5	5.3	0.3									
18	(E, Z) Farnésol	1685	0.5	1.2	2.1	0.5	1.1	1.9	0.9	0.3	0.4									
19	α-Bisabolol	1698										0.3	0.2	0.1	0.4	0.5	0.1	0.2	-	0.1
20	(E, E)-Farnésol	1708										4.4	4.7	4.3	3.2	3.6	3.2	4.3	3.1	1.6
21	Phytone	1745	<b>21.4</b>	<b>30.8</b>	<b>13</b>	<b>27.7</b>	<b>36.1</b>	<b>20</b>	<b>23.8</b>	<b>11.3</b>	<b>30.6</b>									
22	Hexadécanol	1862										0.7	0.9	0.6	tr	0.6	0.5	0.5	0.7	0.2
23	Cembrene	1929	<b>23</b>	<b>7.1</b>	<b>6.0</b>	<b>22.5</b>	<b>2.6</b>	<b>8.2</b>	<b>16.7</b>	<b>28.6</b>	<b>9.2</b>									
24	Acide hexadecanoïque	1940	<b>12.7</b>	<b>7.4</b>	<b>8.4</b>	<b>12.8</b>	<b>8.9</b>	<b>8.9</b>	<b>13</b>	<b>11.2</b>	<b>13.1</b>									
25	Eicosane	2031	3.1	2.6	4.6	3.7	3.2	7.7	4.9	4.3	10.2									
26	(E)-Phytol	2103	0.9	5.4	12.4	2.7	6.8	8.3	3.1	3.0	0.7	3.1	2.6	4.6	3.7	-	7.7	3.6	0.6	0.9
	<b>Taux d'identification%</b>		<b>83.3</b>	<b>89.4</b>	<b>85.7</b>	<b>92.5</b>	<b>85.2</b>	<b>83.5</b>	<b>83.7</b>	<b>81.4</b>	<b>88.9</b>	<b>98.1</b>	<b>97.3</b>	<b>97.5</b>	<b>89.5</b>	<b>90.1</b>	<b>98.1</b>	<b>96.9</b>	<b>94.9</b>	<b>97.7</b>
	Monoterpènes oxygénés		-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.1	3.5	3.9	3.8	3.1	3.1	3.5	2.6	0.9
	Sesquiterpènes hydrocarbonés		13.9	21.7	25.8	14.1	17.4	19.5	15.4	13	16.9	64.4	68.1	66.4	63.7	67.6	65.6	70	71.2	75.8
	Sesquiterpènes oxygénés		8.3	14.4	15.5	9.0	10.2	10.9	6.8	10	8.2	25.7	20.3	20.4	17.0	17.6	19.9	17.5	18.2	18.8
	Diterpènes hydrocarbonés		23	7.1	6.0	22.5	2.6	8.2	16.7	28.6	9.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Diterpènes oxygénés		0.9	5.4	12.4	2.7	6.8	8.3	3.1	3.0	0.7	3.1	2.6	4.6	3.7	-	7.7	3.6	0.6	0.9

hydrocarbonés non- terpéniques	3.1	2.6	4.6	3.7	3.2	7.7	4.9	4.3	10.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxygénés non- terpéniques	34.1	38.2	21.4	40.5	45	28.9	36.8	22.5	43.7	1.8	2.8	2.2	1.3	1.8	1.8	2.3	2.3	1.3

<sup>a</sup> L'ordre de l'élution est donné sur la colonne apolaire (DB-5MS)

<sup>b</sup> Indice de rétention sur colonne apolaire DB-5MS (RI<sub>a</sub>)

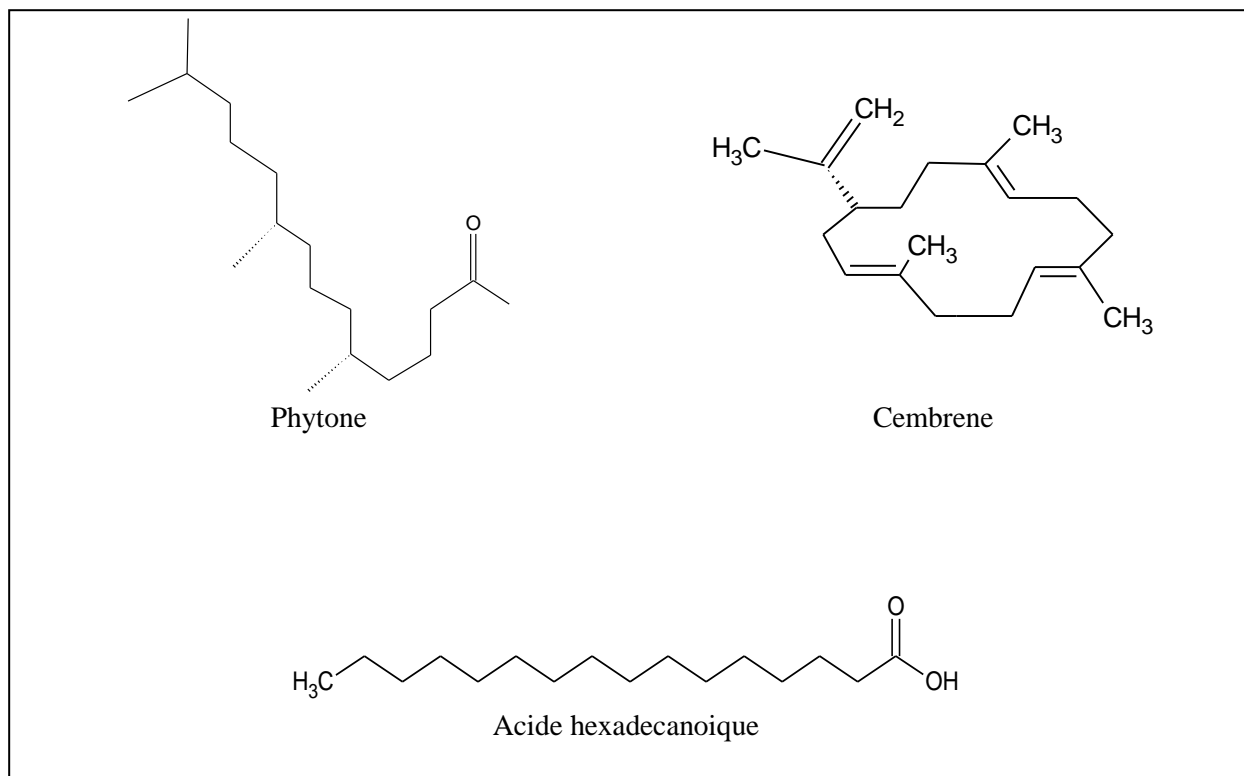
<sup>c</sup>Stations: S1, Ouled ouadfel; S2, Ain fezza; S3, Mafrouch; S4, Harrachi; S5, Sidi aissa; S6, Terni; S7, Khenous; S8, Zalboun,

COL<sup>d</sup> huile essentielles collective des parties aériennes

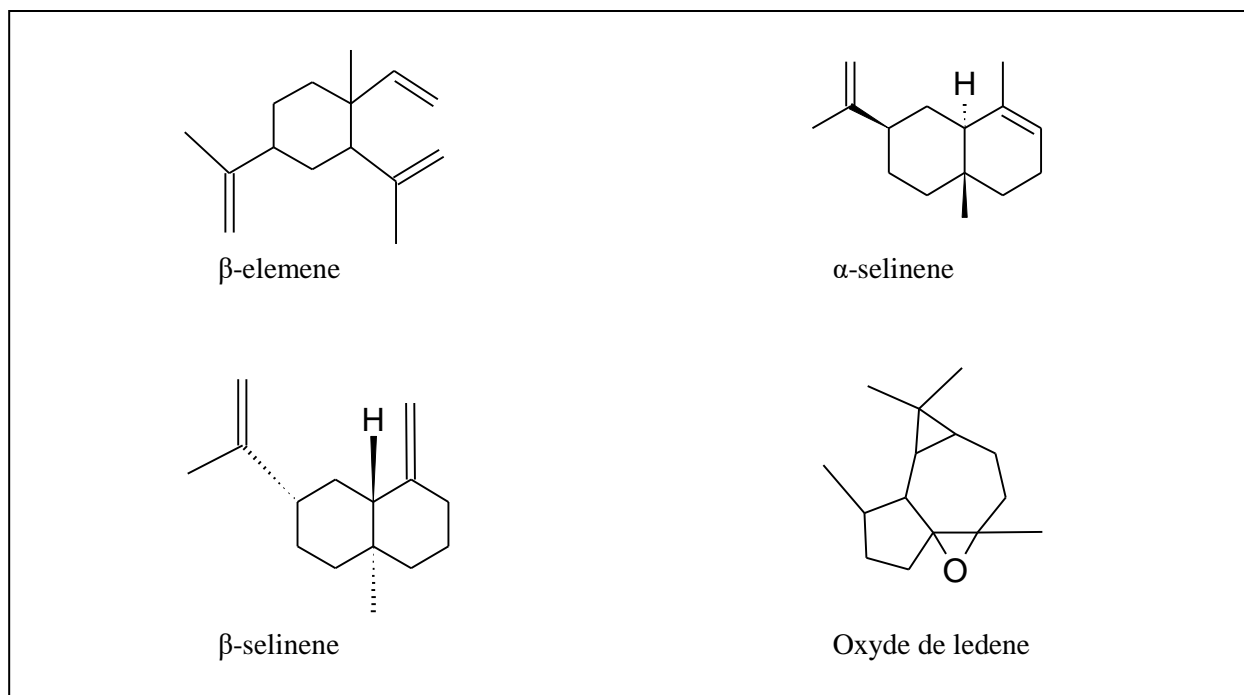
COL<sup>e</sup> huile essentielles collective des racines

tr, trace (< 0.05%),

**Tableau 16 :** Variabilité chimique des huiles essentielles de *Atractylis humilis*



**Figure 21 :** Structures chimiques des principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle de la partie aérienne de *A. humilis*.



**Figure 22 :** Structures chimiques des principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle de la racine de *A. humilis*.

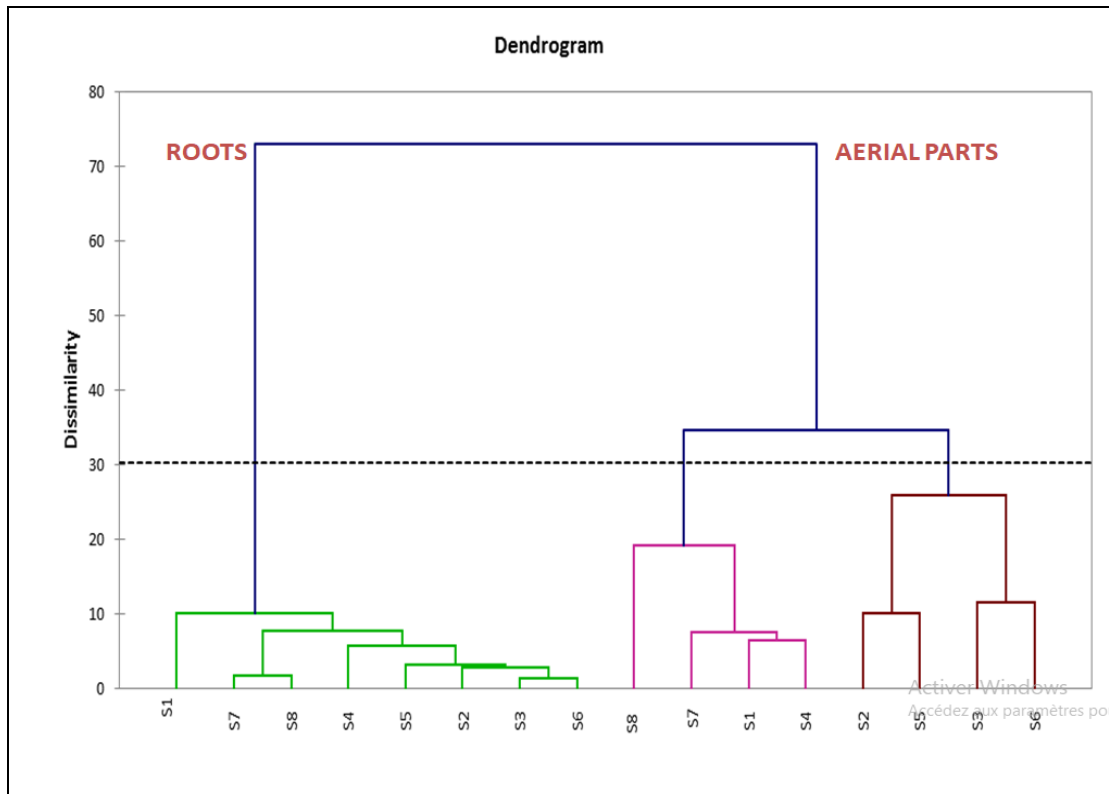
### III.4.3. Variabilité chimique inter-stations des huiles essentielles de *Atractylis humilis*

L'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse de cluster (CA ; dendrogramme) ont été appliquées pour identifier d'éventuelles corrélations entre les compositions chimiques des HE et les origines géographiques des échantillons.

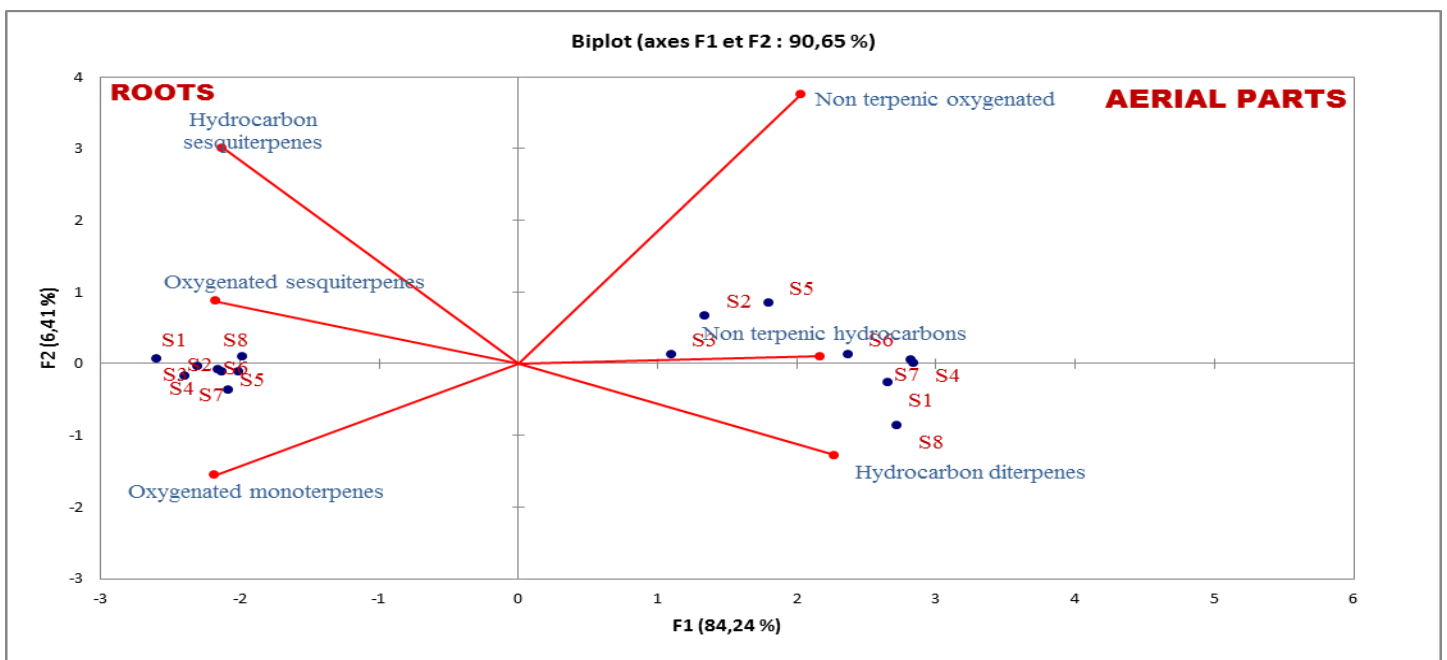
Les données exposées dans les (**Figures 23** et **24**) ont été tirées de la matrice de corrélation et de la matrice normalisée liant les compositions des HE aux localisations des échantillons. Huit échantillons d'HE extraites des parties aériennes et des racines ont été étudiés afin d'obtenir un meilleur aperçu sur la variabilité chimique des HE de *A. humilis*. Des différences quantitatives ont été observées dans la famille de composés des différentes stations (S1-S8) en raison de leur localisation géographique. L'analyse de cluster (**Figure 23**) a montré des différences significatives. Le dendrogramme a été obtenu en utilisant la méthode du voisin le plus proche ; cela suggère qu'il s'agit de deux clusters principaux d'HE de *A. humilis*. Un cluster comprenait tous les échantillons d'HE des parties aériennes et l'autre cluster comprenait tous les échantillons d'HE des racines. Le premier groupe (I) comprend les échantillons d'HE des parties aériennes provenant de huit localités (S1-S8) alors que le groupe (II) contient ceux des racines. Le groupe (I) est subdivisé en deux sous-groupes ; le sous-groupe Ia (S1, S4, S7, S8) et le sous-groupe Ib (S2, S3, S5, S6). Les deux premiers axes de l'ACP (**Figure 24**) représentaient respectivement 84,24 et 6,41% de la variance totale. Ces résultats confirment que les HE produites par les parties aériennes étaient différentes de celles obtenues à partir des racines. Les HE des racines (groupe II) ont été principalement dominées par les teneurs en sesquiterpènes hydrocarbonés (63,7-71,2%) et en sesquiterpènes oxygénés (17,0-25,7%).

Sur la base des analyses ACP et CA (**Figures 23** et **24**), les classes familiales principales de la partie aérienne ont montré des corrélations significatives avec les localisations des échantillons. Cependant, les HE de la partie aérienne (sous-groupe Ia) étaient caractérisées par des quantités appréciables de diterpènes hydrocarbonés (16,7-28,6%) tandis que le sous-groupe Ib était caractérisé par des composés oxygénés non terpéniques (21,4-45,0%) et des hydrocarbures non terpéniques (2,6-7,7%). Les spécimens des localités Ouled ouadfel, Harrachi, khenous et Zalboun (sous-groupe Ia) produisent des HE dominées par des diterpènes hydrocarbonés, tandis que les spécimens poussant dans les localités Ain fezza, Mafrouch, Sidi aissa et Terni (sous-groupe Ib) produisent des HE dominées par des composés oxygénés non terpéniques.





**Figure 23 :** Classification hiérarchique ascendante (CHA) des huiles essentielles de *A. humilis*



**Figure 24 :** Analyse en composantes principales (ACP) de la composition chimique des huiles essentielles de *A. humilis*

### III.5. Évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des différents extraits de *Atractylis humilis*

#### III.5.1. Test du piégeage du radical libre DPPH

Le radical libre DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante. C'est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les extraits testés. Ce virage de couleur est accompagné d'une diminution de l'absorbance mesurée à 515nm, après 30 minutes à l'obscurité, suite à la réduction du radical par l'extrait de la plante.

Conventionnellement, une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydante. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de l'extrait et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cet extrait.

Dans cette étude, ont été testées les activités antioxydantes de l'huile essentielle, de l'extrait aqueux et de l'extrait méthanolique des deux parties de la plante.

Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les valeurs relatives à l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits, exprimées en IC<sub>50</sub> (mg/mL), sont présentées dans le **Tableau 17**. La comparaison et la validation des résultats sont effectuées en utilisant l'acide ascorbique comme contrôle positif.

**Tableau 17** : Les concentrations IC<sub>50</sub> des extraits de *Atractylis humilis* par la méthode DPPH.

	IC <sub>50</sub> (mg/mL)		
	Huile essentielle	Extrait aqueux	Extrait méthanolique
Partie aérienne	25.64 ± 0.04	0.20 ± 0.09	0.057 ± 0.03
Racine	32.94 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.06 ± 0.09
Acide ascorbique	0.06 ± 0.01		

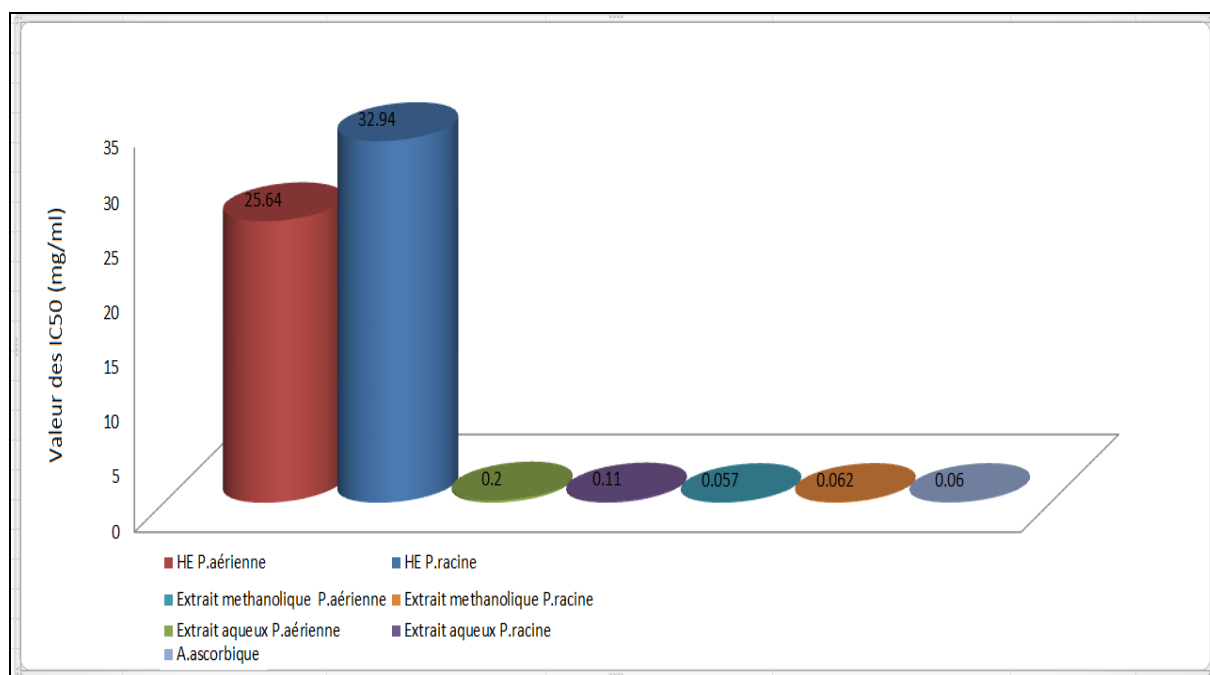
**Tableau 18** : Activité antioxydante des extraits de *Atractylis humilis* par la méthode DPPH à différentes concentrations

Organe		Huile essentielle					Extrait aqueux					Extrait méthanolique					
Partie aérienne	Concentration (mg/mL)	40	30	20	10	5	0.6	0.3	0.1	0.05	0.02	0.1	0.08	0.07	0.04	0.02	
	Inhibition %	71.5	58.7	39.1	18.3	6	82.3	65.2	30.5	15.3	9.4	81.6	69.2	58.2	38.1	21.8	
	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	<b>25.64 ± 0.04</b>					<b>0.20 ± 0.09</b>					<b>0.057 ± 0.03</b>					
Racine	Concentration (mg/mL)	40	30	20	10	5	0.2	0.1	0.08	0.05	0.04	0.1	0.08	0.07	0.04	0.02	
	Inhibition %	60.8	45.2	31.9	16.2	5.5	77.8	62.2	27.2	19.0	18.2	90	64.5	57.8	29.2	11.7	
	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	<b>32.94 ± 0.06</b>					<b>0.11 ± 0.02</b>					<b>0.062 ± 0.09</b>					
Acide ascorbique	Concentration (mg/mL)	0.08					0.06					0.05					0.04
	Inhibition %	97.9					50.4					39.0					20.7
	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	<b>0.06 ± 0.01</b>															

D'après les résultats du **Tableau 18**, les activités antiradicalaires les plus faibles ont été observées chez l'huile essentielle de la partie aérienne et celle des racines pour une concentration de 40 mg/mL ; les valeurs des taux d'inhibition du radical DPPH sont respectivement de l'ordre de 71.5% et 60.8%. Toutefois, les activités de piégeage du radical les plus fortes reviennent aux extraits méthanoliques de la partie aérienne et des racines avec des pourcentages d'inhibition respectifs de l'ordre de 81.6% et 89.9% et ce, pour une concentration de 0.1 mg/mL.

D'autre part, les extraits aqueux des racines et de la partie aérienne présentent des activités antiradicalaires assez bonnes de valeurs respectives de 75.61% et 82.30% pour des concentrations de 0.3 mg/mL et 0.6 mg/mL respectivement **Tableau 18**.

En comparant les valeurs des  $IC_{50}$  des différents extraits à celle de l'acide ascorbique, les extraits méthanoliques de la partie aérienne ( $IC_{50} = 0.057$ ) et des racines ( $IC_{50} = 0.062$ ) présentent des valeurs de même ordre que celle de l'acide ascorbique ( $IC_{50} = 0.06$ ) utilisé comme contrôle positif. Ces deux extraits présentent donc, des propriétés antioxydantes intéressantes similaires à celle de l'acide ascorbique (**Figure 25**).



**Figure 25** : Comparaison des concentrations  $IC_{50}$  des extraits de *A. humilis*.

### III.5.2. Test de la réduction du fer : FRAP

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son pouvoir antioxydant.

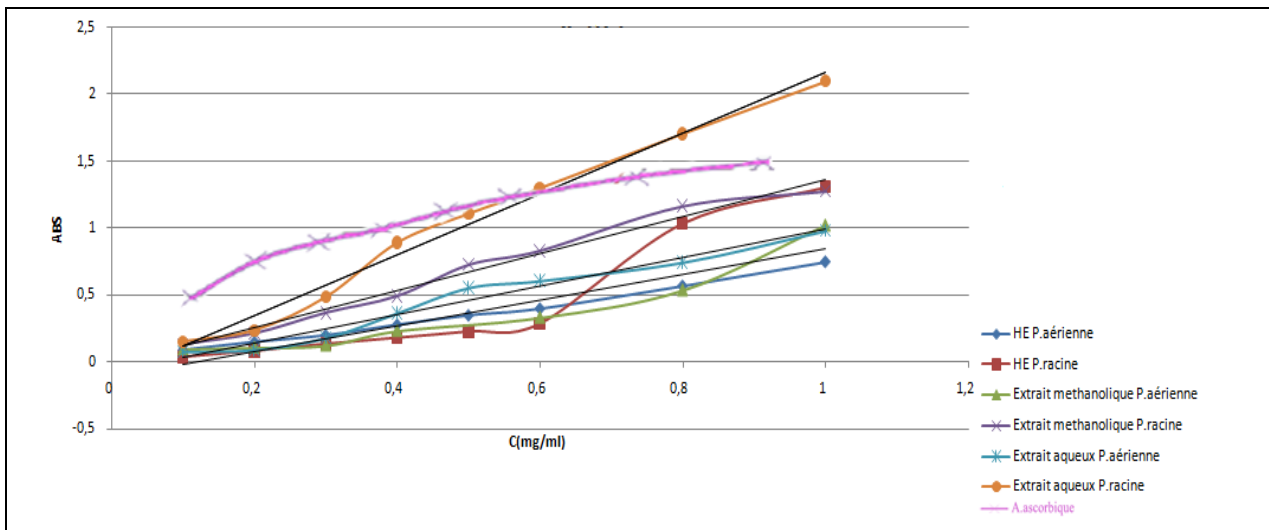
Les activités antioxydantes des huiles essentielles et des différents extraits de la partie aérienne et des racines de *A. humilis* ont été évaluées par la méthode FRAP.

Une gamme de dilutions en cascade des différents extraits à tester allant de 0.1 à 1 mg/mL, a été réalisée.

Les résultats des densités optiques (DO) ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait (**Figure 26**)

En général, le pouvoir réducteur augmente avec l'augmentation de la concentration testée. Il s'avère que l'huile essentielle et l'extrait aqueux des racines se caractérisent par le pouvoir antioxydant le plus élevé et qu'ils ont été même meilleurs que l'acide ascorbique utilisé comme témoin. Comme cela a été suggéré, les composés oxygénés, en particulier ceux contenant des groupements hydroxyle, étaient bien connus pour leur capacité antioxydante élevée. Les HE de la partie aérienne composés de 57,6% de composés oxygénés devraient être plus actives que les HE des racines qui contenaient 21,9% de composés oxygénés [188].

Cependant, les activités les plus faibles ont été enregistrées chez les autres extraits de la partie aérienne.



**Figure 26** : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode FRAP de *A. humilis*

### III.6. Évaluation de l'activité antibactérienne

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de la partie aérienne et des racines de *Atractylis humilis* sont regroupés dans le **Tableau 19**.

A la lecture du **Tableau 19**, à l'exception de l'extrait aqueux des racines, tous les extraits investigués ont réagi positivement sur au moins une des souches bactériennes testées.

*Enterococcus faecalis* est la seule souche de bactérie qui s'est montrée totalement résistante à tous les extraits. Elle est suivie de la souche *Escherichia coli* qui n'est sensible qu'aux HE des racines avec un diamètre d'inhibition de 7mm. Les autres souches se

comportent différemment avec des diamètres compris entre 7 et 15mm. En présence d'HE des racines, *S. aureus* reste le microorganisme le plus sensible avec un diamètre d'inhibition important (15,0 mm) tandis que l'effet des HE de la partie aérienne était modérément actif mais légèrement moins prononcé contre la même souche. Deux antibiotiques témoins Gentamicine (CN) et Tobramycine (TOB) utilisés contre *S. aureus* ont présenté un diamètre de zone d'inhibition de 16,0 mm. Pour les autres bactéries Gram-positives, les HE des racines étaient modérément sensibles contre *B. cereus* et *B. subtilis* avec le même diamètre d'inhibition (12,0 mm) alors que les HE de la partie aérienne n'étaient pas actives sur ces deux souches. Le TOB utilisé comme contrôle a montré une valeur de zone d'inhibition égale à 12,0 mm pour *B. cereus* et 16,0 mm pour *B. subtilis*.

Dans le cas des bactéries Gram-négatives, toutes les souches testées ont été considérées comme non sensibles aux HE des racines et présentaient un diamètre de zone d'inhibition inférieur ou égal à 8,0 mm tandis que les HE de la partie aérienne n'exerçaient une activité sensible modérée que contre *P. aeruginosa* avec 9,0 mm de diamètre. Trois antibiotiques standards (CN, CIP et TOB) ont été utilisés comme témoins pour ces souches et leurs valeurs de zone d'inhibition varient de 12,0 à 33,0 mm. Enfin, les valeurs des zones d'inhibition des HE de *A. humilis* sont restées généralement bien inférieures à celles des témoins standards, à l'exception des HE des racines contre *S. aureus* par rapport à CN et TOB.

Quant aux autres extraits, l'extrait aqueux des racines s'est montré inactif vis-à-vis de toutes les souches alors que celui de la partie aérienne a présenté une sensibilité modérée contre *B. subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 12,0 mm. En outre, l'extrait méthanolique des racines s'est avéré plus actif contre les différentes souches que l'extrait méthanolique de la partie aérienne où *B. subtilis* reste la bactérie la plus sensible vis-à-vis des deux extraits.

De plus, la méthode CMI a également été réalisée pour les tests de sensibilité de tous les extraits de *A. humilis* vis-à-vis des bactéries et la détermination quantitative de leur efficacité antibactérienne. Pour les souches bactériennes qui se sont montrées sensibles par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide (**Figure 27**), les valeurs de CMI ont été déterminées et sont présentées dans le **Tableau 20**. La souche *S. aureus* était modérément sensible à l'extrait aqueux de la partie aérienne mais très sensibles aux HE de la partie aérienne et des racines avec des CMI de 3.90 et 7.81  $\mu\text{L}/\text{mL}$  respectivement. Pour les souches de *Bacillus*, les HE de la partie aérienne n'étaient pas assez actives sur les deux souches tandis que les HE des racines étaient sensibles contre *B. cereus* (CMI = 3.90  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) et *B. subtilis* avec une CMI égale à 1.95  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Par ailleurs, à l'exception de *E. faecalis* et *E. coli*, l'extrait méthanolique des racines est très sensible à toutes les autres souches accusant des CMI dont les valeurs varient de 1.56 à 3.12 mg/mL **Tableau 20**.

En revanche, toutes les bactéries Gram-négatives se sont révélées insensibles aux HE de *A. humilis* et y étaient plus résistantes que les bactéries Gram-positives. Il a longtemps été expliqué que la présence, dans les microorganismes à Gram négatif, de la barrière de perméabilité de la membrane externe, limite l'accès des agents antimicrobiens [189].

L'efficacité acceptable des HE des racines vis-à-vis des bactéries à Gram positif peut être attribuée aux principaux composés détectés, en particulier à la présence du  $\beta$ -élémane. En effet, il a été rapporté que les données de la littérature montrent l'activité de nombreuses huiles essentielles contenant du  $\beta$ -élémane contre différentes bactéries pathogènes notamment *S. aureus* [190]. Cependant, cette activité peut être liée à la composition chimique et à la configuration structurelle de leurs composés avec des interactions antagonistes synergiques entre eux [191].

Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) de *A. humilis*

	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	Partie aérienne			Racines			Antibiotiques standard		
	HE	Extrait aqueux	Extrait méthanolique	HE	Extrait aqueux	Extrait méthanolique	Gent	CIP	TOB
<b>Bactérie Gram +</b>									
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.00 ± 00	7.00 ± 00	-	15.00 ± 0.01	-	7.00 ± 0.01	16	30	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	14	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	9.00 ± 0.02	12.00 ± 0.02	-	10.00 ± 0.02	24	27	12
<i>Bacillus subtilis</i>	8.00 ± 0.03	12.00 ± 0.03	10.00 ± 0.04	12.00 ± 00	-	11.00 ± 00	-	25	16
<b>Bactérie Gram -</b>									
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	7.00 ± 0.02	-	-	21	33	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.00 ± 0.01	8.00 ± 0.01	9.00 ± 00	8.00 ± 0.01	-	8.00 ± 0.03	19	33	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	8.00 ± 00	-	7.00 ± 0.04	-	7.00 ± 0.01	21	28	15

-Test négatif



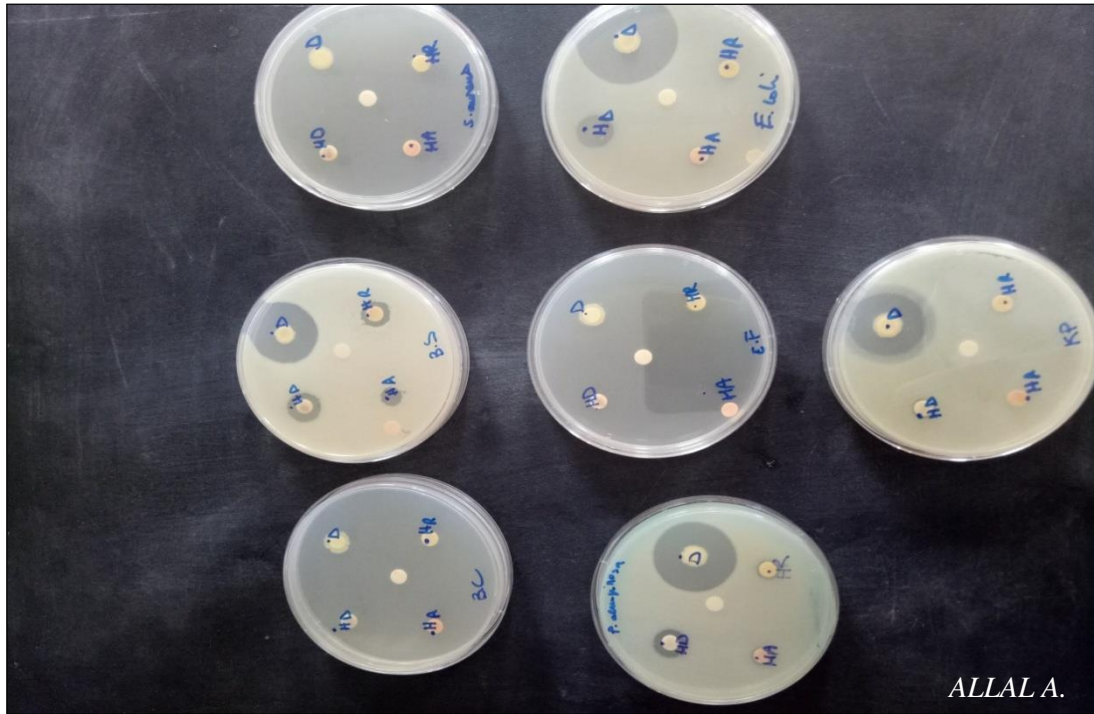


Figure 27 : Diamètres des zones d'inhibition des HE de *A. humilis*

Tableau 20 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de *A. humilis*

	Partie aérienne			Racines		
	Huile essentielle (µL/mL)	Aqueux (mg/mL)	Méthanolique (mg/mL)	Huile essentielle (µL/mL)	Aqueux (mg/mL)	Méthanolique (mg/mL)
<b>Bactérie Gram +</b>						
<i>S. aureus</i>	3.90 ± 0.03	0.78 ± 0.04	-	7.81 ± 0.02	-	3.125 ± 0.03
<i>E. feacalis</i>	-			-	-	
<i>B. cereus</i>	-	-	3.125 ± 0.08	3.90 ± 00	-	1.56 ± 0.02
<i>B. subtilis</i>	125 ± 0.02	3.125 ± 0.01	3.125 ± 0.05	1.95 ± 0.02	-	3.125 ± 0.09
<b>Bactérie Gram -</b>						
<i>E. coli</i>	-	-	-	62.50 ± 0.01	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	62.50 ± 0.02	3.125 ± 0.05	3.125 ± 0.04	15.62 ± 0.04	-	3.125 ± 0.02
<i>K. pneumoniae</i>	-	3.125 ± 0.01	-	125.00 ± 00	-	1.56 ± 00

-Test négatif

### III.7. Évaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de la partie aérienne et des racines de *A. humilis* a été évaluée vis à vis de trois champignons pathogènes, à savoir *P. expansum*, *F. graminearum* et *Z. tritici*, en utilisant deux méthodes différentes : la diffusion et la fumigation.

Les résultats obtenus par les deux méthodes ont montré une variabilité de l'inhibition de croissance mycélienne des trois souches testées **Tableau 21**.

La souche *P. expansum* était plus sensible par fumigation aux huiles essentielles que les souches de *F. graminearum* et *Z. tritici*. D'autre part, par la méthode de contact (diffusion), la souche *F. graminearum* était moins sensible que les autres souches.

En comparant les tests de fumigation et de diffusion, la méthode de diffusion s'est avérée la plus efficace pour inhiber la croissance mycélienne, sauf pour *F. graminearum* qui n'était pas sensible aux huiles essentielles avec des pourcentages d'inhibition très faibles allant de 20 à 28% pour les deux tests.

En revanche, les huiles essentielles de la partie aérienne semblaient être plus prononcées pour la réduction des mycéliums de *Z. tritici*, avec un pourcentage d'inhibition de 73% que l'huile essentielle des racines alors que les deux autres souches cibles présentaient une sensibilité comparable envers les huiles essentielles de *A. humilis*.

**Tableau 21** : Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de *A. humilis*


Traitement	% d'inhibition	
	HE	HE
	Partie aérienne	Racine
	<i>P. expansum</i>	
Diffusion	60 ± 0.03	70 ± 0.01
Fumigation	60 ± 0.01	53 ± 0.06
	<i>F. graminearum</i>	
Diffusion	24 ± 0.01	20 ± 0.02
Fumigation	28 ± 0.03	28 ± 0.01
	<i>Z. tritici</i>	
Diffusion	73 ± 0.04	42 ± 0.03
Fumigation	37 ± 0.02	-
- Test négatif		

Concentration de l'échantillon = volume d'huile injecté/volume de la boîte pétri

L'unité est le microlitre/mL air ; Volume de la boîte pétri=57 mL ; Volume d'huile injecté=5 µL

Enfin, nos résultats indiquent que les huiles essentielles de *A. humilis* présentent une activité antifongique limitée à la concentration testée (0.087 $\mu$ L/mL air) contre ces souches cibles. Les valeurs d'indice antifongique obtenues pour les HE sont restées faibles et qui ne dépassent pas les 73%. D'ailleurs, cela nous a empêché de déterminer la CMI des deux huiles essentielles.

Il a été signalé que l'effet antifongique des huiles essentielles est attribué à leurs principaux composants, où une relation entre l'activité antifongique et les structures chimiques de ces composés a été suggérée dans l'ordre décroissant : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > esters > hydrocarbures [192-194]. Cette règle est en accord avec nos résultats, car les huiles essentielles de la partie aérienne et des racines sont pauvres en composés phénoliques mais dominées par les hydrocarbures dont la capacité à réduire le développement fongique est limitée.



*CONCLUSION  
GENERALE*

## CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire des substances naturelles et bioactives dont l'un de ses objectifs majeurs est la contribution à une meilleure protection et gestion de l'environnement par la valorisation des ressources végétales (huiles essentielles, extrait d'hydrolat et autres extraits végétaux). Pour cela, nous avons sélectionné deux plantes médicinales spontanées de la région de Tlemcen ; *Daphne gnidium* L. (Thymelaeaceae) et *Atractylis humilis* L. (Asteraceae). Ces deux espèces oubliées et parfois négligées, demeurent sous-utilisées par les populations dans le traitement de certaines pathologies. Par ailleurs, si la première espèce est relativement peu étudiée, la deuxième n'a pas été décrite dans la littérature.

Au préalable, une enquête ethnobotanique effectuée auprès de la population locale nous a permis de récolter des informations portant sur la personne et de connaître les utilisations courantes des deux plantes. Pour *D. gnidium*, c'est la partie aérienne qui sert dans les soins de cheveux alors que les racines décoctées de *A. humilis* constituent l'organe le plus utilisé pour traiter les maladies gastro-intestinales et les infections urinaires. Cette enquête nous a révélé encore d'autres usages non décrits auparavant.

Un screening phytochimique réalisé sur la partie aérienne de chacune des deux plantes nous a permis de mettre en évidence la présence des groupes des familles chimiques. Pour *D. gnidium*, les tests de caractérisation ont révélé la présence des flavonoïdes, des composés réducteurs, des tanins et des saponosides. Cependant, les alcaloïdes, les coumarines et les stéroïdes ainsi que l'amidon étaient absents. Quant à *A. humilis*, les groupes de composés identifiés sont les alcaloïdes, les flavonoïdes, les composés réducteurs, les tanins, les stérols et les stéroïdes alors que les coumarines, l'amidon et les saponosides sont totalement absents.

Le dosage quantitatif des composés phénoliques dans *D. gnidium* a montré des quantités importantes en polyphénols et en flavonoïdes mais faibles en tanins. En outre, *A. humilis* était marquée par la richesse de l'extrait aqueux des racines en polyphénols totaux et en flavonoïdes par rapport à la partie aérienne. Pour les tanins, la teneur la plus élevée se trouve dans l'extrait méthanolique des racines et l'extrait aqueux de la partie aérienne alors que la quantité la plus faible est constatée dans l'extrait aqueux des racines.

Les composés volatils représentés par l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat ont été investigués. Les HE ont été obtenues par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger et l'extrait d'hydrolat par une extraction liquide-liquide. Leurs rendements sont exprimés par rapport à la matière végétale sèche.

Les huiles essentielles ainsi que l'extrait d'hydrolat de la partie aérienne de *D. gnidium* sont étudiés pour la première fois où leurs compositions chimiques ont été analysées par CPG et CPG-SM. Leurs rendements d'extraction sont de 0.015 % et de 0.018% respectivement. Le nombre de composés identifiés dans l'HE et l'extrait d'hydrolat est de quatre-vingt-dix-neuf et

trente-deux représentant, respectivement 95,5% et 81,4% de la composition totale de l'extrait. L'HE est dominée par les composés oxygénés et est caractérisée par un pourcentage élevé de monoterpènes oxygénés (36,9%), suivis des composés oxygénés sesquiterpéniques (23,2%) et non terpéniques (21,2%). Le profil chromatographique de l'extrait d'hydrolat n'a montré que des composés oxygénés (81,4%) dominés par des monoterpènes (48,2%), suivis par des composés oxygénés non terpéniques (26,7%). Par ailleurs, les composés hydrocarbonés n'ont été trouvés que dans l'HE, à un pourcentage de 13,6%. Les principaux constituants de l'huile essentielle étaient la carvone (12,7%), suivie du spathuléol (11,2%). D'autre part, les principaux composés présents dans l'extrait d'hydrolat étaient la carvone (10,9%) et le carvacrol (10,9%).

De plus, la composition en acides gras de la partie aérienne de *D. gnidium* déterminée par CPG et CPG-SM, a permis d'identifier 13 acides dont l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide oléique sont prépondérants avec des teneurs respectives de l'ordre de 30%, 24% et de 14.6%.

Quant à l'espèce *A. humilis*, la préparation d'extraits bruts aqueux et méthanolique a montré que l'extrait aqueux des racines a présenté le rendement le plus élevé (8,2%). Le même extrait possède les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes par rapport à celles de la partie aérienne. Pour l'extrait méthanolique, les composés phénoliques sont plus présents dans les racines que dans la partie aérienne. En outre, la teneur en tanins la plus faible est constatée dans l'extrait aqueux des racines.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'extraction et l'analyse des huiles essentielles de la partie aérienne et des racines de *A. humilis* en provenance de huit stations différentes. Les rendements en HE des racines sont nettement supérieurs à ceux de la partie aérienne et varient de 0,010 à 0,070%. Pour chacune des deux parties, le profil chimique qualitatif des divers échantillons est presque le même. Quinze composés ont été identifiés dans les HE de la partie aérienne et 14 composés dans les racines représentant respectivement (81,4-92,5%) et (89,5-98,1%) de la composition totale des huiles. Par comparaison des deux parties de la plante et à l'exception de trois composés qui sont le  $\beta$ -élémane, le  $\beta$ -sélinène et le (E)-phytol, les deux compositions chimiques des HE sont complètement différentes. Les HE de la partie aérienne sont caractérisées par une teneur élevée en composés non terpéniques suivis de sesquiterpènes alors que celles des racines étaient dominées par des composés sesquiterpéniques comme le  $\beta$ -élémane connu pour son efficacité thérapeutique contre les cellules tumorales et les troubles inflammatoires justifiant par ailleurs quelques utilisations traditionnelles de *A. humilis*. D'autre part, la variabilité chimique inter stations des HE de *A. humilis* a été investiguée. En appliquant l'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse de cluster (CA), des différences quantitatives significatives ont été observées dans la famille de composés des différentes stations en raison de leur localisation géographique. Ces résultats confirment que les HE de la partie aérienne étaient différentes de celles des racines qui ont été principalement dominées par les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés.

Le volet appliqué de cette thèse est consacré aux activités biologiques des deux espèces étudiées. Pour *D. gnidium*, nous avons testé les activités antioxydantes de l'huile essentielle, l'extrait d'hydrolat, les extraits méthanolique et aqueux de la partie aérienne en utilisant deux méthodes courantes FRAP et DPPH. Il s'est avéré que les extraits aqueux et méthanolique ont la meilleure capacité de réduire le radical DPPH accusant respectivement des valeurs des IC<sub>50</sub> de 0.10 et 0.12 mg/mL. Quant à la fraction volatile, c'est l'hydrolat avec une IC<sub>50</sub> de 0.62 mg/mL qui présente la meilleure activité antiradicalaire. Par la méthode FRAP, c'est l'extrait aqueux qui présente le meilleur pouvoir antioxydant alors que les activités les plus faibles ont été trouvées chez l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat. Il ressort des résultats précédents que les activités antioxydantes de tous les extraits demeurent inférieures à celle de l'acide ascorbique pris comme référence. En ce qui concerne *A. humilis*, les activités antiradicalaires les plus faibles reviennent à l'huile essentielle de la partie aérienne et des racines avec des taux d'inhibition du radical DPPH respectifs de l'ordre de 71.5% et 60.8%. Toutefois, les activités de piégeage du radical les plus fortes sont observées chez les extraits méthanoliques de la partie aérienne et des racines. Ces deux extraits présentent des valeurs de IC<sub>50</sub> de même ordre que celle de l'acide ascorbique et possèdent donc des propriétés antioxydantes intéressantes similaires à celle de l'acide. En utilisant la méthode FRAP, l'huile essentielle et l'extrait aqueux des racines ont présenté le pouvoir antioxydant le plus élevé et même meilleur que celui de l'acide ascorbique. En effet, les composés oxygénés, en particulier ceux portant des groupements hydroxyle, sont caractérisés par leur capacité antioxydante élevée.

L'étude de l'activité antibactérienne de *D. gnidium* a été réalisée sur sept souches de référence par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide. Les extraits étudiés ont contribué à l'inhibition de toutes les souches testées à divers degrés où l'huile essentielle a présenté une activité antibactérienne très intéressante. En effet, en présence de l'huile essentielle, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* étaient les micro-organismes les plus sensibles avec des diamètres d'inhibition très importants de 36, 31 et 30 mm respectivement, présentant des CMI inférieures à 0.24 µL/mL, suivis de *B. subtilis* (28 mm), *B. cereus* (27 mm) et *K. pneumoniae* (25 mm). Cependant, l'extrait d'hydrolat, les extraits aqueux et méthanolique se sont montrés moins actifs vis-à-vis de la croissance des bactéries avec des diamètres d'inhibition plus faibles. Les terpènes présents en abondance dans les HE et connus pour leur activité contre un grand nombre de microorganismes, pourraient être à l'origine de leur activité. Néanmoins, à cause de la complexité des HE, l'activité antimicrobienne pourrait ne pas être due à un composé spécifique ou prédominant mais à un possible effet de synergie entre les différents constituants. Par ailleurs, un test d'écotoxicologie des extraits précédents sur des larves d'Artémis a été évalué. L'analyse des résultats obtenus selon les lignes directrices de l'OCDE et l'UE montre que l'huile essentielle et l'extrait méthanolique sont plus toxiques que l'extrait aqueux.

Concernant l'espèce *A. humilis*, tous les extraits investigués ont réagi positivement sur, au moins une des souches bactériennes testées, à l'exception de l'extrait aqueux des racines qui s'est montré inactif. Par ailleurs, *E. faecalis* est la seule bactérie qui s'est montrée totalement résistante à tous les extraits alors que *S. aureus* reste le microorganisme le plus

sensible vis-à-vis des HE des racines avec un important diamètre d'inhibition. Cette efficacité pourrait être attribuée aux principaux composés détectés, en particulier à la présence du  $\beta$ -élémane. D'autre part, l'activité antifongique des huiles essentielles de la partie aérienne et des racines de *A. humilis* testée sur trois champignons pathogènes : *P. expansum*, *F. graminearum* et *Z. tritici*, en utilisant deux méthodes différentes : la diffusion et la fumigation a montré une variabilité de l'inhibition de croissance mycélienne des trois souches testées. Par comparaison des deux tests, la méthode de diffusion s'est avérée plus efficace que la fumigation pour inhiber la croissance mycélienne, sauf pour *F. graminearum* qui n'était pas sensible aux huiles essentielles avec des pourcentages d'inhibition très faibles. De plus, les HE présentent une activité antifongique limitée à la concentration testée ( $0.087\mu\text{L}/\text{mL}$  air) où les valeurs d'indice antifongique obtenues sont restées faibles ne dépassant pas les 73%. Ce résultat est en accord avec la composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne et des racines qui sont pauvres en composés phénoliques mais dominées par les composés hydrocarbonés dont la capacité à réduire le développement fongique est limitée.

Au vu des résultats fort intéressants obtenus, *D. gnidium* et *A. humilis* sont deux plantes qui pourraient être à caractère médicinale justifiant quelques-unes de leurs utilisations traditionnelles. En perspectives, une étude plus approfondie des extraits de ces deux plantes permettrait de mettre en évidence les molécules responsables des activités biologiques testées. Par ailleurs, le test d'écotoxicologie de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique sur les larves d'Artémis, pourrait être étendu à des concentrations plus faibles afin de déterminer leurs  $DL_{50}$ .

Enfin, cette étude contribuerait à la valorisation de ces deux espèces jusque-là négligés et sous-utilisées.



## Références bibliographiques

1. Leite, P. M., Camargos, L. M., and Castilho, R. O. (2021) Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective, *European Journal of Integrative Medicine* 41, 101270.
2. Falzon, C. C., and Balabanova, A. (2017) Phytotherapy: an introduction to herbal medicine, *Primary Care: Clinics in Office Practice* 44, 217-227.
3. Bouhadjera, K. (2005) contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* r. br. et *Aristida pungens* L, Thèse de Doctorat en chimie organique appliqué. Université Abou Bekr Belkaid ....
4. Pisoschi, A. M., and Pop, A. (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European journal of medicinal chemistry* 97, 55-74.
5. Lemaoui, C.-E., Layaida, H., Badi, A., and Foudi, N. (2017) Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques, *Journal des Anti-infectieux* 19, 12-19.
6. Petronilho, S., Maraschin, M., Coimbra, M. A., and Rocha, S. M. (2012) In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.), *Industrial crops and products* 40, 1-12.
7. M.Florence (2012) *Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles. Etude de cas en maison de retraite.*
8. Guenther, E., and Althausen, D. (1948) *The essential oils*, Vol. 1, Van Nostrand New York.
9. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils—a review, *Food and chemical toxicology* 46, 446-475.
10. Muñoz-Olivas, R. (2004) Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 23, 203-216.
11. Marriott, P. J., Shellie, R., and Cornwell, C. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *Journal of Chromatography A* 936, 1-22.
12. Augusto, F., e Lopes, A. L., and Zini, C. A. (2003) Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22, 160-169.
13. Joulain, D. (1994) Modern analysis methodologies: use and abuse, *Perfumer & flavorist* 19, 5-17.
14. Bauer, K., Garbe, D., and Surburg, H. (2008) *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*, John Wiley & Sons.

15. Takeoka, G. R., Buttery, R. G., Ling, L. C., Wong, R. Y., Dao, L. T., Edwards, R. H., and Berrios, J. D. J. (1998) Odor thresholds of various unsaturated branched esters, *LWT-Food Science and Technology* 31, 443-448.
16. Nagata, Y. (1990) Determination of odor threshold value by triangle odor bag method, *Annu Rep Jpn Environ Sanit Cent* 17, 77-89.
17. Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S., and Schnitzler, J. P. (2006) Practical approaches to plant volatile analysis, *The plant journal* 45, 540-560.
18. Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., and Palmas, F. (1999) In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils, *Letters in applied microbiology* 29, 130-135.
19. Figueiredo, M. A., Nowak, R. D., and Wright, S. J. (2007) Gradient projection for sparse reconstruction: Application to compressed sensing and other inverse problems, *IEEE Journal of selected topics in signal processing* 1, 586-597.
20. AFNOR, N. (1992) Recueil des Normes Françaises. Huiles Essentielles, *AFNOR: Paris*.
21. Européenne, P. (1996) Sainte Ruffine: Conseil de l'Europe Maisonneuve SA.
22. FERNANDEZ, X., and CABROL-BASS, D. (2007) Analyse des arômes.
23. Clevenger, J. (1928) Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type, *American Perfumer & Essential Oil Review*, 467-503.
24. Price, L., and Price, S. (2004) *Understanding hydrolats: the specific hydrosols for aromatherapy: a guide for health professionals*, Churchill Livingstone.
25. Paolini, J. (2005) Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae* endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*.
26. Barboni, T. (2006) Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie.
27. Anton, R. (2005) *Lobskin A-Plantes Aromatiques, Epices, Aromates, Condiments Et Huiles Essentielles*.
28. ARPINO, P. (2008) *Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. II*, Ed. Techniques Ingénieur.
29. Paolini, J. (2005) Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux *Asteraceae* endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*, p 26.38.

30. Darriet, F. (2011) Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum Corse-Sardaigne: *Chamaemelum mixtum*, *Anthemis maritima* et *Eryngium maritimum*, Université Pascal Paoli.
31. Breitmaier, E. (2006) Terpenes: Importance, general structure, and biosynthesis, *Terpenes: Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones 2006*, 1-9.
32. Darriet-Giudicelli, F. (2011) Caractérisation de nouvelles molécules et variabilité chimique de trois plantes du continuum Corse-Sardaigne: *Chamaemelum Mixtum*, *Anthemis Maritima*, *Eryngium Maritimum*, Corte.
33. Moro Buronzo, A. (2008) Grand guide des huiles essentielles (Ed) Hachette pratique, p 23-25.
34. Bahorun, T. (1998) Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists*.
35. Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3e éd.)*, Tec & Doc ed., Lavoisier, Paris.
36. Lugasi, A. (2003) The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases, *Acta Biologica Szegediensis* 47, 119-125.
37. King, A., and Young, G. (1999) Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, *Journal of the American Dietetic Association* 99, 213-218.
38. Tapiero, H., Tew, K., Ba, G. N., and Mathe, G. (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?, *Biomedicine & pharmacotherapy* 56, 200-207.
39. Boizot, N., and Charpentier, J.-P. (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, *Le Cahier des Techniques de l'INRA, In: Numéro spécial*, 79-82.
40. Martin, S., and Andriantsitohaina, R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium, In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, pp 304-315, Elsevier.
41. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical reviews in food science and nutrition* 45, 287-306.
42. Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilár, F., and Felinger, A. (2010) Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species, *Journal of Chromatography A* 1217, 7972-7980.
43. Moutsatsou, P. (2007) The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding, *HORMONES-ATHENS-* 6, 173.
44. Dacosta, Y. (2003) *Les phytonutriments bioactifs*, Ed. Yves Dacosta, p317, Paris.

45. Babar Ali, M., Hahn, E., and Paek, K. (2007) Methyljasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor, *Molecules* 12, 607-621.
46. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., and Abdelly, C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *Comptes Rendus Biologies* 331, 372-379.
47. Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1220-1234.
48. Piquemal, G. (2008) Les flavonoïdes.
49. Karaali, A., Boyacioğlu, D., Güneş, G., and Özçelik, B. (2004) Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA, *European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey.*
50. Malešev, D., and Kuntić, V. (2007) Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions, *Journal of the Serbian chemical society* 72, 921-939.
51. Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., and Van Leeuwen, P. A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *The American journal of clinical nutrition* 74, 418-425.
52. Ghedira, K. (2005) Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, *Phytothérapie* 3, 162-169.
53. Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A., and Mornar, A. (2004) Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids, *Croatica chemica acta* 77, 361-366.
54. Milane, H. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Strasbourg 1.
55. Leonard, E., Yan, Y., and Koffas, M. A. (2006) Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*, *Metabolic engineering* 8, 172-181.
56. Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, J.-P., Ankit, M., Khedid, K., and El Bachiri, A. (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco, *Int. J. Agric. Biol* 11, 205-208.
57. Ref'at, A. A., Takruri, H. R., and Al-Sayyed, H. (2008) Tannin contents of selected plants used in Jordan, *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4, 265-274.

58. Kansole, M. M. R. (2009) Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R, *Brown*, *Hoslundia opposita vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. *Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso*.
59. Bruneton, J. (1993) Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales (2e éd), Tec & Doc ed., Paris.
60. Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews* 12, 564-582.
61. Khanbabaee, K., and van Ree, T. (2001) Tannins: classification and definition, *Natural product reports* 18, 641-649.
62. Akroum, S. (2011) Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels.
63. Paris, M., and Hurabielle, M. (1981) *Abrégé de matière médicale: Pharmacognosie. (Tome1)*. Ed Masson.pp:102-103-104-107, Masson, Paris.
64. Sánchez-Moreno, C. (2002) Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, *Food Science and Technology International* 8, 121-137.
65. Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., and Fritsch, P. (2004) Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments, *médecine/sciences* 20, 458-463.
66. Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 1841-1856.
67. Chavéron, H. (1999) *Introduction à la toxicologie nutritionnelle*, Editions Tec & Doc,pp98, Paris.
68. Guo, Y., Fan, J., Qu, L., Bao, C., Zhang, Q., Dai, H., and Yang, R. (2019) Natural products as sources of new antioxidants: Synthesis and antioxidant evaluation of Mannich bases of novel sesamol derivatives, *Industrial crops and products* 141, 111762.
69. Comhair, S. A., and Erzurum, S. C. (2002) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 283, L246-L255.
70. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., and Jay-Allemand, C. (2005) *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*, PPUR presses polytechniques.
71. Berset, C., and Cuvelier, M. (1996) Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power, *Sciences des Aliments (France)*.

72. Rolland, Y. (2004) Antioxydants naturels végétaux, *Oléagineux, Corps gras, Lipides 11*, 419-424.
73. Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., and Lima, J. L. (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta 613*, 1-19.
74. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *nature 181*, 1199-1200.
75. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., and Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science and Technology 28*, 25-30.
76. Molyneux, P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol 26*, 211-219.
77. Benzie, I. F., and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, *Analytical biochemistry 239*, 70-76.
78. Pulido, R., Bravo, L., and Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of agricultural and food chemistry 48*, 3396-3402.
79. Harley, J. P., Klein, D. A., Prescott, L. M., Sherwood, L. M., Willey, J. M., and Woolverton, C. J. (2010) *Microbiologie* Ed De Boeck ed., deboeck.
80. Schwalbe, R., Steele-Moore, L., and Goodwin, A. C. (2007) *Antimicrobial susceptibility testing protocols*, Crc Press.
81. Barros, L., Calhelha, R. C., Vaz, J. A., Ferreira, I. C., Baptista, P., and Estevinho, L. M. (2007) Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts, *European Food Research and Technology 225*, 151-156.
82. Clinical, and Institute, L. S. (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement, *CLSI Document M100-S21*.
83. Okigbo, R. N., Okorie, R. E., and Putheti, R. R. (2009) In vitro effects of garlic (*Allium sativum* L.) and African basil (*Ocimum gratissimum* L.) on pathogens isolated from rotted cassava roots, *Interciencia 34*, 742-747.
84. Lemaire, G., Terouanne, B., Mauvais, P., Michel, S., and Rahmani, R. (2004) Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro, *Toxicology and applied pharmacology 196*, 235-246.
85. Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., Patel, K., Kashyap, R., Kulkarni, P., and Rajan, B. (2003) Effect of endosulfan on male reproductive development, *Environmental Health Perspectives 111*, 1958-1962.

86. Watson, L. (1992) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval, <http://biodiversity.uno.edu/delta.htm>.
87. Heywood, V. H. (1996) *Les Plantes à Fleurs*, Nathan ed., Paris.
88. Borris, R. P., Blaskó, G., and Cordell, G. A. (1988) Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae, *Journal of ethnopharmacology* 24, 41-91.
89. Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., and Younos, C. (1991) Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea, *Journal of ethnopharmacology* 35, 123-143.
90. Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosie Phytochimie, Plantes Médicinales*, 3ème Technique & Documentation ed., Paris.
91. Reynaud, J. (2002) *La flore du pharmacien*, Lavoisier ed., Paris.
92. P. Quezel, and Santa, S. (1963) *Nouvelle flora de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II*, C.N.R.S. ed., Paris.
93. Boucher, C., and Doux, Y. (2011) *Guide des arbres et arbustes de méditerranée*, Delachaux et Niestlé ed., Paris.
94. Miara, M., Hammou, M. A., and Aoul, S. H. (2013) Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie), *Phytothérapie* 11, 206-218.
95. Guide illustré de la flore algérienne.
96. Leclerc, H. (1999) *Essai de la thérapeutique par les plantes français. In : Précis de phytothérapie*, 5ème Elsevier Masson ed., Paris.
97. Bnouham, M., Mekhfi, H., Legssyer, A., and Ziyyat, A. (2002) Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Ethnopharmacology forum, International Journal of Diabetes and Metabolism* 10, 33-50.
98. Chase, M. W., and Reveal, J. L. (2009) A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III, *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 122-127.
99. Bruneton, J. (1987) *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Lavoisier, paris.
100. Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., and Benjelloun, W. (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *Journal of ethnopharmacology* 58, 45-54.
101. Bellakhdar, J. (1997) *La pharmacopée marocaine traditionnelle*.
102. Vidal, V., Potterat, O., Louvel, S. v., Hamy, F. o., Mojarrab, M., Sanglier, J.-J., Klimkait, T., and Hamburger, M. (2011) Library-based discovery and characterization

- of daphnane diterpenes as potent and selective HIV inhibitors in *Daphne gnidium*, *Journal of natural products* 75, 414-419.
103. Chaabane, F., Krifa, M., Matera, E., Loussaief, A., Dijoux-Franca, M.-G., Ghedira, K., Dumontet, C., and Chekir-Ghedira, L. (2014) In vitro antileukaemic activity of extracts from *Daphne gnidium* leaves against sensitive and multidrug resistant K562/R7 cells, *Tumor Biology* 35, 8991-8998.
  104. M.Botineau (2015) *Fruit rouge à maturité, Garou* . In :*Guide des plantes à charnus comestible et toxiques*, Lavoisier, Paris.
  105. Freeman, P., Ritchie, E., and Taylor, W. (1979) The constituents of Australian *Pimelea* spp. I. The isolation and structure of the toxin of *Pimelea simplex* and *P. trichostachya* Form B responsible for St. George disease of cattle, *Australian Journal of Chemistry* 32, 2495-2506.
  106. Lin, L.-C., Yang, K.-Y., Chen, Y.-F., Wang, S.-C., and Tsai, T.-H. (2005) Measurement of daphnoretin in plasma of freely moving rat by liquid chromatography, *Journal of chromatography A* 1073, 285-289.
  107. Ferrari, J. (2002) Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles:" *Gnidia involucrata*" Steud. ex A. Rich, Université de Lausanne, Faculté des sciences.
  108. Cottigli, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Caus, M., Pompei, R., and Bonsignore, L. (2001) Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L, *Phytomedicine* 8, 302-305.
  109. Huang, S. Z., Zhang, X. J., Li, X. Y., Kong, L. M., Jiang, H. Z., Ma, Q. Y., Liu, Y. Q., Hu, J. M., Zheng, Y. T., and Li, Y. (2012) Daphnane-type diterpene esters with cytotoxic and anti-HIV-1 activities from *Daphne acutiloba* Rehd, *Phytochemistry* 75, 99-107.
  110. Harizi, H., Chaabane, F., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2011) Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*, *Cellular Immunology* 267, 94-101.
  111. Iauk, L., Aleo, G., Caccamo, F., Rapisarda, A., Ragusa, S., and Speciale, A. (1996) Antibacterial and antimycotic activities of *Daphne gnidium* L. leaf extracts, *Phytotherapy Research (United Kingdom)*.
  112. Iauk, L., Aleo, G., Caccamo, F., Rapisarda, A., Ragusa, S., and Speciale, A. (1997) Comparative evaluation of antibacterial and antimycotic activities of *Daphne gnidium* L. leaf and bark extracts, *Farmaci e terapia* 14, 37-43.
  113. Rapisarda, A., Germanò, M., Iauk, L., La Rosa, M., Sanogo, R., and Ragusa, S. (1998) *Daphne gnidium* L. bark and leaf extracts: skin damage by topical application, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 12, 49-51.



114. Mak, P., Leung, Y.-K., Tang, W.-Y., Harwood, C., and Ho, S.-M. (2006) Apigenin suppresses cancer cell growth through ER $\beta$ , *Neoplasia* 8, 896-904.
115. Chaabane, F., Pinon, A., Simon, A., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2014) Chloroform leaf extract of *Daphne gnidium* inhibits growth of melanoma cells and enhances melanogenesis of B16-F0 melanoma, *South African Journal of Botany* 90, 80-86.
116. Chaouki, W., Meddah, B., and Hmamouchi, M. (2015) Antiproliferative and apoptotic potential of *Daphne gnidium* L. root extract on lung cancer and hepatoma cells, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 70, 205-210.
117. Mohammedi, Z., and Atik, F. (2013) Fungitoxic effect of natural extracts on mycelial growth, spore germination and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*, *Australian Journal of Crop Science* 7, 293.
118. Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L., and Dessi, M. (2003) Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80, 65-70.
119. Chaabane, F., Mokdad-Bzeouich, I., Sassi, A., Mustapha, N., Majouli, R., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2016) Genoprotective and neuroprotective effects of *Daphne gnidium* leaf methanol extract, tested on male mice, *Drug and chemical toxicology* 39, 297-302.
120. Selles, C. (2012) Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen: *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M.
121. Barkley, T., Brouillet, L., and Strother, J. (2006) *Flora of North America, Asteraceae, part 1*, Oxford University Press, New York, Ny, USA.
122. Ozenda, P. (1991) *Flore et végétation du Sahara*, 3ème édition CNRS ed., Paris
123. Bellakhdar, J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle, *Médecine arabe ancienne et savoirs populaires* 189.
124. Bessada, S. M., Barreira, J. C., and Oliveira, M. B. P. (2015) Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review, *Industrial crops and products* 76, 604-615.
125. Ghafoul, M. (2010) Contribution à un diagnostic des groupements végétaux dans un milieu steppique en désertification. Cas de Aïn D'heb – Tiaret, UNIVERSITE ZIANE ACHOUR – DJELFA.
126. Cheriti, A., Rouissat, A., Sekkoum, K., and Balansard, G. (1995) Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El-Bayadh (Algérie), *Fitoterapia* 66, 525-538.

127. Daniele, C., Dahamna, S., Firuzi, O., Sekfali, N., Saso, L., and Mazzanti, G. (2005) *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review, *Journal of ethnopharmacology* 97, 175-181.
128. Zhu, B., Zhang, Q.-l., Hua, J.-w., Cheng, W.-l., and Qin, L.-p. (2018) The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Atractylodes macrocephala* Koidz.: A review, *Journal of ethnopharmacology* 226, 143-167.
129. Hammiche, V., Merad, R., and Azzouz, M. (2013) *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*, Springer Paris.
130. Cheriti, A., Rouissat, A., Sekkoum, K., and Balansard, G. (1995) Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El-Bayadh (Algérie), *Fitoterapia (Milano)* 66, 525-538.
131. Gaudeau, C., and Gouthiere, L. (1991) Médicaments a base d'*Atractylis gummifera* et variétés alba, lyrata, ovata, humilis, cancellata et leurs dérivés dans le traitement des pathologies cancéreuses de pathologies inflammatoires et pathologies immuno-dépressives. French Patent FR2658420-A1.
132. Akram, M. M., Naima, B., Eddine, M. S., and Soumia, B. (2018) Anti-Inflammatory, Anti-pyretic and Acute Toxicity Effects of n-Butanol Extract of *Atractylis flava* Desf in Rats, *Pharmacognosy Journal* 10.
133. Badaoui, M. I., Alabdul Magid, A., Benkhaled, M., Bensouici, C., Harakat, D., Voutquenne-Nazabadioko, L., and Haba, H. (2019) Pyrroloquinolone A, a new alkaloid and other phytochemicals from *Atractylis cancellata* L. with antioxidant and anticholinesterase activities, *Natural product research*, 1-7.
134. Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., and Faouzi, M. E. A. (2020) Phytochemical investigation, in vitro and in vivo antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L, *Journal of ethnopharmacology*, 112640.
135. Guo, W.-Q., Li, L.-Z., He, Z.-Y., Zhang, Q., Liu, J., Hu, C.-Y., Qin, F.-J., and Wang, T.-Y. (2013) Anti-proliferative effects of *Atractylis lancea* (Thunb.) DC. via down-regulation of the c-myc/hTERT/telomerase pathway in Hep-G2 cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14, 6363-6367.
136. Deiva, S., Ferguson, L., Rateb, M. E., Williams, R., and Brucoli, F. (2020) 2-furyl (phenyl) methanol isolated from *Atractylis gummifera* rhizome exhibits anti-leishmanial activity, *Fitoterapia* 140, 104420.
137. Chabani, S., Haba, H., Lavaud, C., Benkhaled, M., and Harakat, D. (2013) Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*, *Phytochemistry Letters* 6, 9-13.
138. Chabani, S., Haba, H., Long, C., and Benkhaled, M. (2016) Chemical composition of medicinal plant *Atractylis serratuloides*, *Industrial Crops and Products* 88, 91-95.

139. Sifouane, S., Benabdelaziz, I., Benkhaled, M., Gómez-Ruiz, S., Carralero, S., and Haba, H. (2020) A new aryltetralin lignan and other phytoconstituents from *Atractylis humilis*, *Biochemical Systematics and Ecology* 90, 104018.
140. Pascual-Villalobos, M., and Robledo, A. (1998) Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants, *Industrial crops and products* 8, 183-194.
141. l'ONS. (2008 ) Recensement de la population algérienne, wilaya de Tlemcen.
142. Organization, U. N. I. D., Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., and Rakesh, D. D. (2008) *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.
143. Sarker, S. D., Latif, Z., and Gray, A. I. (2006) Natural product isolation, In *Natural products isolation*, pp 1-25, Springer.
144. Trease, E. (1987) Pharmacognosie, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62, *KARUMI Y, ONYAYILI PA et OGUGDUAJA 2004*, 179-182.
145. Debray, M., Jacquemin, H., and Razafindrambo, R. (1971) Travaux et documents de l'Orstom, *Paris, France*.
146. Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R. M. (1999) [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, In *Methods in enzymology*, pp 152-178, Elsevier.
147. Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., and Zeng, B. (2008) In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, *LWT-Food science and Technology* 41, 597-603.
148. Sutour, S. (2010) Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats.
149. König, W., Hochmuth, D., and Joulain, D. (2001) Terpenoids and related constituents of essential oils, library of massfinder 2.1, *University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry: Hamburg*.
150. Council, N. R., Sciences, D. E. P., Board, L. A., and Research, P. B. F. (2008) *An Assessment of the National Institute of Standards and Technology Building and Fire Research Laboratory: Fiscal Year 2008*, National Academies Press.
151. Adams, R. (2001) Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectrometry, *Carol Stream (IL): Allured Publishing Corporation*.
152. Donahue, M., Porter, D., Lau, J., and McMichael, R. (1999) Interagency report NISTIR 6376. National institute of standards and technology, Gaithersburg, *NIST Journal of Research* 114, 57-67.
153. Kapseu, C., and Parmentier, M. (1997) Composition en acides gras de quelques huiles végétales du Cameroun, *Sciences des aliments* 17, 325-331.

154. Bendiabdellah, A. A. (2014) Etudes chimique et biologique des extraits de trois *Daucus* (*D. crinitus*, *D. muricatus* et *D. carota* ssp *hispanicus*) de la région de Tlemcen, Thèse Doctorat. Université Abou Bekr Belkaïd De Tlemcen. 4-129.
155. Bougandoura, N., and Bendimerad, N. (2013) Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq, *Nature & Technology*, 14.
156. Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reaction, *The Japanese journal of nutrition and dietetics* 44, 307-315.
157. Singleton, V. L., and Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
158. Wayne, P. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
159. Agbogidi, O. (2010) Ethno-botanical survey of the non-timber forest products in Sapele Local Government Area of Delta State, Nigeria, *African Journal of Plant Science* 4, 183-189.
160. Belem, B., Olsen, C. S., Theilade, I., Bellefontaine, R., Guinko, S., Lykke, A. M., Diallo, A., and Boussim, J. I. (2008) Identification des arbres hors forêt préférés des populations du Sanmatenga (Burkina Faso), *BOIS & FORETS DES TROPIQUES* 298, 53-60.
161. Camou-Guerrero, A., Reyes-García, V., Martínez-Ramos, M., and Casas, A. (2008) Knowledge and use value of plant species in a Rarámuri community: a gender perspective for conservation, *Human ecology* 36, 259-272.
162. Rachid, A., Rabah, D., Farid, L., Zohra, S. F., Houcine, B., and Nacéra, B. (2012) Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria, *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 2041-2050.
163. Merzouki, A., Ed-Derfoufi, F., and Mesa, J. M. (2000) Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco), *Fitoterapia* 71, 278-307.
164. Ma, Z., and Porter, L. (1988) Tannins from Bendo Eucalyptus, *Journal of Integrative Plant Biology* 30, 534-538.
165. Skadhauge, B., Gruber, M. Y., Thomsen, K. K., and Von Wettstein, D. (1997) Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissues, *American Journal of Botany* 84, 494-503.
166. Joulain, D., and König, W. A. (1998) *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*, EB-Verlag.

167. de Souza, C. O., Valenzuela, C. A., Baker, E. J., Miles, E. A., Rosa Neto, J. C., and Calder, P. C. (2018) Palmitoleic acid has stronger anti-inflammatory potential in human endothelial cells compared to oleic and palmitic acids, *Molecular nutrition & food research* 62, 1800322.
168. De Caterina, R. (2011) n-3 fatty acids in cardiovascular disease, *New England Journal of Medicine* 364, 2439-2450.
169. Anderson, B. M., and Ma, D. W. (2009) Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal?, *Lipids in health and Disease* 8, 33.
170. Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., and Robards, K. (2002) Methods for testing antioxidant activity, *Analyst* 127, 183-198.
171. Amorati, R., Foti, M. C., and Valgimigli, L. (2013) Antioxidant activity of essential oils, *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 10835-10847.
172. Elmastaş, M., Dermirtas, I., Isildak, O., and Aboul-Enein, H. Y. (2006) Antioxidant activity of S-carvone isolated from spearmint (*Mentha Spicata* L. Fam Lamiaceae), *Journal of liquid chromatography & related technologies* 29, 1465-1475.
173. Shen, X., Chen, W., Zheng, Y., Lei, X., Tang, M., Wang, H., and Song, F. (2017) Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of *Areca catechu* L. and *Cocos nucifera* L, *Industrial crops and products* 96, 110-119.
174. Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., and Sagratini, G. (2017) Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour, *Food chemistry* 221, 689-697.
175. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free radical biology and medicine* 20, 933-956.
176. Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., and Aruoma, O. (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, *Food and chemical toxicology* 32, 31-36.
177. Miguel, M. G. (2010) Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review, *Molecules* 15, 9252-9287.
178. Vásquez-García, A., de Oliveira, A. P. S. C., Mejia-Ballesteros, J. E., de Godoy, S. H. S., Barbieri, E., de Sousa, R. L. M., and Fernandes, A. M. (2019) *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil, *Aquaculture* 504, 158-163.
179. Aitboulahsen, M., Zantar, S., Amin, L., Mohammed, E., Abdelhay, A., Chairi, H., Bakkali, M., and Hassani Zerrouk, M. (2018) Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Against Pathogens Isolated from Food,

- Crops and Hospitals in Morocco, *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 21, 1450-1459.
180. Houicher, A., Hamdi, M., Hechachna, H., and Özogul, F. (2018) Chemical composition and antifungal activity of *Anacyclus valentinus* essential oil from Algeria, *Food Bioscience* 25, 28-31.
  181. Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G., and von Wright, A. (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria, *Journal of agricultural and food chemistry* 46, 3590-3595.
  182. Tan, N., Satana, D., Sen, B., Tan, E., Altan, H. B., Demirci, B., and Uzun, M. (2016) Antimycobacterial and antifungal activities of selected four *Salvia* species, *Records of Natural Products* 10, 593.
  183. Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components, *Frontiers in microbiology* 3, 12.
  184. Füller, T. N., Bertrand, C., Simon, A., de Barros, I. B. I., and Neto, J. F. B. (2014) *Elionurus muticus* as an alternative source of citral from Pampa biome, Brazil, *Journal of oleo science* 63, 1109-1116.
  185. Europe, C. o. (1997) *European pharmacopoeia*, 3rd ed., Strasbourg.
  186. Breerton, R. G. (2003) *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*, John Wiley & Sons.
  187. Zhai, B., Zhang, N., Han, X., Li, Q., Zhang, M., Chen, X., Li, G., Zhang, R., Chen, P., and Wang, W. (2019) Molecular targets of  $\beta$ -elemene, a herbal extract used in traditional Chinese medicine, and its potential role in cancer therapy: a review, *Biomedicine & pharmacotherapy* 114, 108812.
  188. Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., and Yar, M. S. (2019) Medicinal prospects of antioxidants: A review, *European journal of medicinal chemistry* 178, 687-704.
  189. Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 56, 395-411.
  190. Zhu, J., Lower-Nedza, A. D., Hong, M., Jiec, S., Wang, Z., Yingmao, D., Tschiggerl, C., Bucar, F., and Brantner, A. H. (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of three essential oils from *Curcuma wenyujin*, *Natural product communications* 8, 1934578X1300800430.
  191. Xiang, F., Bai, J., Tan, X., Chen, T., Yang, W., and He, F. (2018) Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* Levl. et Van. var. *argyi* cv. Qiai, *Industrial crops and products* 125, 582-587.

192. Kurita, N., and Koike, S. (1983) Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components, *Agricultural and biological chemistry* 47, 67-75.
193. López-Meneses, A. K., Sánchez-Mariñez, R. I., Quintana-Obregón, E. A., Parra-Vergara, N. V., González-Aguilar, G. A., López-Saiz, C. M., and Cortez-Rocha, M. O. (2017) In vitro antifungal activity of essential oils and major components against fungi plant pathogens, *Journal of Phytopathology* 165, 232-237.
194. Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., and Baskaran, D. (2019) Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications, *Grain & Oil Science and Technology*.

# ANNEXE 1 :

## Enquête ethnobotanique sur

*Daphne gnidium* L. \*

### Profil de l'informateur :

1. *Sexe* :  Masculin  Féminin

2. *Age* :  <20  [20-30]  [30-40]  [40-50]  [50-60]  >60

3. *Niveau d'étude* :  Analphabète  Primaire  Moyen  Secondaire  Universitaire

4. *Situation familiale* :  Marié  Célibataire  Veuf  Divorcé

5. *Origine de l'information* :  Ancêtres  Lecture  Herboriste  Autres

### Questions :

1. *Utilisez-vous les plantes médicinales pour des soins ?*  Oui  Non

2. *Avez-vous déjà vu cette plante ?*  Oui  Non

3. *Connaissez-vous la plante *Daphne gnidium* ?*  Oui  Non

4. *Quel est le nom local de *Daphne gnidium* ?*

5. *- Utilisez-vous cette plante pour des soins ?*

*- lesquels ?*

6. *Connaissez-vous d'autres utilisations de *Daphne gnidium* ?*

*- lesquels ?*



**7. *Quels sont les maladies soignées par cette plante ?***

**8. *Cette plante est-elle utilisée seule ou associée à d'autres plantes ?***

**9. *Partie utilisée :***  Racines  Tiges  Feuilles  Fleurs

**10. *Quelle est la période de collecte :***

**11. *Etat de la matière végétale utilisée :***  Sec  Frais

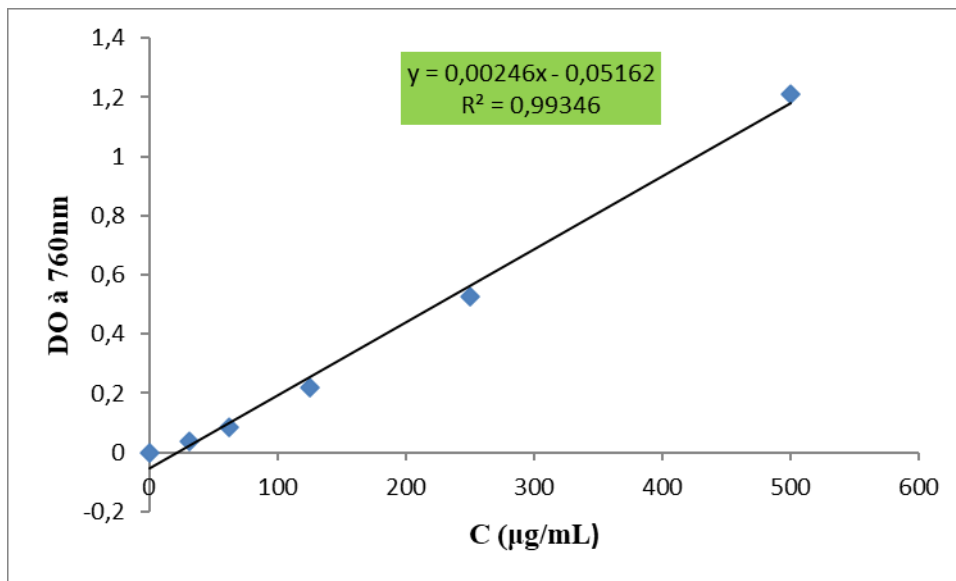
**12. *Mode d'utilisation :***  Poudre  Décoction  Macération  Infusion  Autres

**13. *Mode de préparation :***

**14. *Autres informations :***

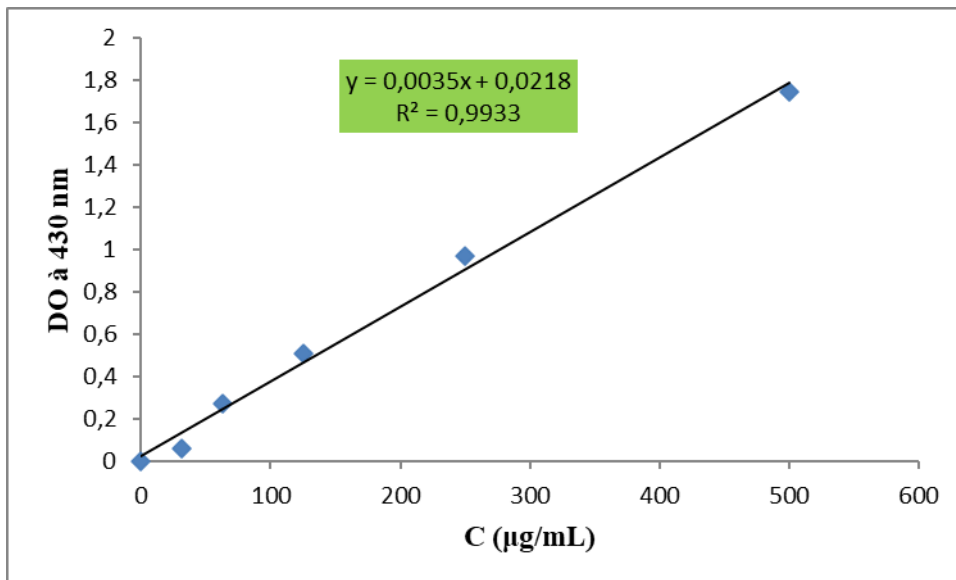
\* Dans le deuxième questionnaire, *Daphne gnidium* est remplacée par *Atractylis humilis*

**Annexe 2 :** la courbe d'étalonnage de l'acide gallique



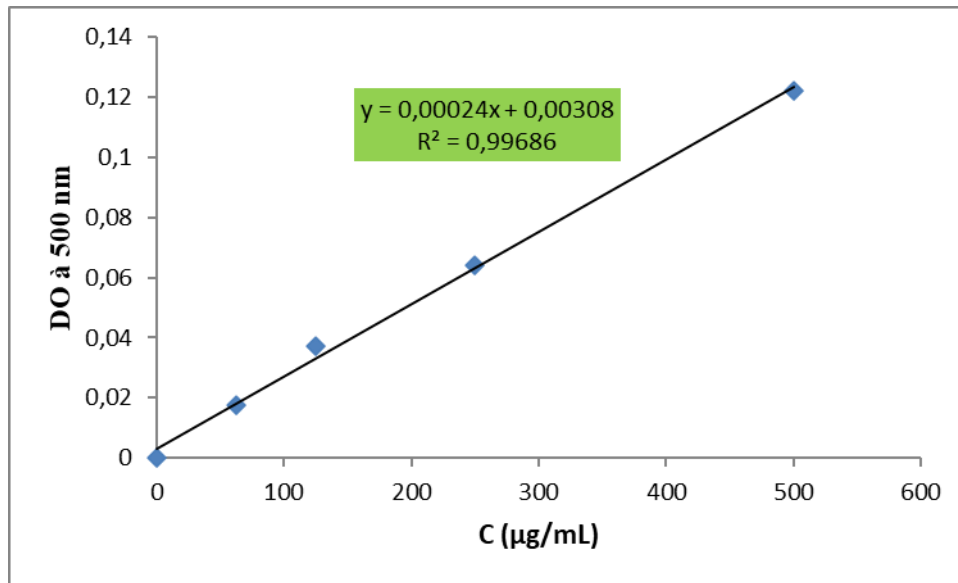
**Figure 28 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

**Annexe 3 :** la courbe d'étalonnage de la quercétine



**Figure 29 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

**Annexe 4 :** la courbe d'étalonnage de la catéchine



**Figure 30 :** Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.

# PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

## PUBLICATIONS :

1. **Asma Allal**, Samia Bellifa, Nassima Benmansour, Chaouki Selles, Mouhamed Semaoui, Hafida Hassaine & Alain Muselli. Essential Oil and Hydrosol Extract Chemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Potential of *Daphne gnidium* L. from Algeria. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2019. **22**(5): p. 1277-1288.

2. Nassima Benmansour, **Asma Allal**, Chaouki Selles, BoufeldjaTabti and Alain Muselli. Essential Oil and Hydrosol Extract Chemical Composition, Phytochemicals of Algerian *Rhus pentaphylla* Desf. and its Antioxidant Activity. Current Bioactive Compounds, 2019. **15**: p. 1-12.

3. Radia Lemouchi, Chaouki Selles, Mohammed El Amine Dib, Nassima Benmansour, **Asma Allal**, Boufeldja Tabti & Kheireddine Ouali. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil and Hydrosol Extract Obtained by Hydrodistillation (HY) and Liquid–Liquid Extraction (LLE) of *Psoralea bituminosa*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 2017. **23**(4): p. 299-307

## COMMUNICATIONS NATIONALES ET INTERNATIONALES:

1. **Asma Allal**, Chaouki Selles, Radia Lemouchi et Nassima Benmansour. « Screening phytochimique et évaluation des activités antioxydantes de quelques extraits de *Psoralea bituminosa* L. », Congrès international de phytothérapie **2017**, du 29 avril au 1er mai 2017, Monastir, **Tunisie**.

2. **Asma Allal**, Chaouki Selles, Radia Lemouchi, Mohamed el Amine Dib et Nassima Benmansour. « Composition chimique et activités antioxydantes de l'huile essentielle et de l'hydrolat de *Psoralea bituminosa* L. », Congrès international de phytothérapie

**2017**, du 29 avril au 1er mai 2017, Monastir, **Tunisie**.

3. Chaouki Selles, Radia Lemouchi, Nassima Benmansour & **Asma Allal**. « Etude phytochimique et activités antioxydantes de quelques extraits de *Teucrium kabylicum* Batt. », 4th International Congress of Plants Biodiversity, 05-08 October **2017**, Marrakech, **Maroc**.

**4. Asma Allal**, Nassima Benmansour, Chaouki Selles and Boufeldja Tabti. « Preliminary phytochemical screening of *Daphne gnidium* L. and chemical composition of aerial part essential oil », 11th International Conference and Exhibition: on Pharmacology and Ethnopharmacologie & International Conference on Pharmaceutical Oncology, July 18-19, **2018**, Atlanta, **USA**.

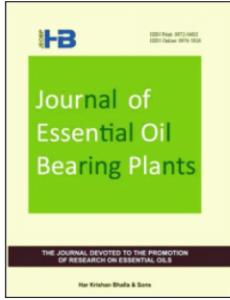
**5.** Nassima Benmansour, **Asma Allal**, Chaouki Selles. « Etude phytochimique et composition chimique de l'huile essentielle de *Euphorbia serrata* L. ». Colloque international Biosciences 2018 « Génie enzymatique et production de métabolites », 28 et 29 Octobre **2018**, Oran, **Algérie**.

**6.** Nassima Benmansour, **Asma Allal**, Chaouki Selles, Mohamed El Amine Dib, Boufeldja Tabti, Alain Muselli. Essential Oil, « Hydrosol Extract profile and some phytochemicals of Algerian *Rhus pentaphylla* Desf. Evaluation of its Antioxidant Activity ». 17th International Days of Biotechnology (IDB2018), 20-23 December **2018**, Sousse, **Tunisia**.

**7. Asma Allal**, Chaouki Selles. « Evaluation de la composition chimique et de l'activité antioxydante de l'huile essentielles et de l'extrait d'hydrolat de *Daphne gnidium* L. », In the Sixth MGIBR International Workshop of Aromatic, Medicinal and condiment plants Virtues and development prospects. That was held in 21-22 December **2020**, Tlemcen University, **Algeria**.

**8. Asma Allal**, Chaouki Selles. « Polyphenols et activité antioxydante de quelques extraits de *Daphne gnidium* L. », In the Sixth MGIBR International Workshop of Aromatic, Medicinal and condiment plants Virtues and development prospects. That was held in 21-22 December **2020**, Tlemcen University, **Algeria**.

**9.** Nassima Benmansour, **Asma Allal**, Chaouki Selles. « Analysis and evaluation of the antioxydant activity of the aqueous and methanol extracts of *Rhus pentaphylla* DESF. », In the Sixth MGIBR International Workshop of Aromatic, Medicinal and condiment plants Virtues and development prospects. 21-22 December **2020**, Tlemcen University, **Algeria**.



## Essential Oil and Hydrosol Extract Chemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Potential of *Daphne gnidium* L. from Algeria

Asma Allal, Samia Bellifa, Nassima Benmansour, Chaouki Selles, Mouhamed Semaoui, Hafida Hassaine & Alain Muselli

To cite this article: Asma Allal, Samia Bellifa, Nassima Benmansour, Chaouki Selles, Mouhamed Semaoui, Hafida Hassaine & Alain Muselli (2019) Essential Oil and Hydrosol Extract Chemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Potential of *Daphne gnidium* L. from Algeria, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 22:5, 1277-1288, DOI: [10.1080/0972060X.2019.1673832](https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1673832)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1673832>



Published online: 12 Dec 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



## Essential Oil and Hydrosol Extract Chemical Profile, Antioxidant and Antimicrobial Potential of *Daphne gnidium* L. from Algeria

Asma Allal <sup>1</sup>, Samia Bellifa <sup>2</sup>, Nassima Benmansour <sup>1</sup>, Chaouki Selles <sup>1\*</sup>,  
Mouhamed Semaoui <sup>1</sup>, Hafida Hassaine <sup>2</sup> and Alain Muselli <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Natural and Bioactive Substances (LASNABIO),  
Department of Chemistry, University of Tlemcen,, Tlemcen, Algeria

<sup>b</sup>Laboratory of Applied Microbiology for Agri-food, Biomedical and Environment  
(LAMAABE), Faculty SNV-STU, University of Tlemcen, BP 119, Tlemcen 13000, Algeria

<sup>c</sup>UMR CNRS 6134, Laboratory of Natural Products Chemistry (CPN),  
University of Corse, Campus Grimaldi, BP 52, Corte 20250, France

Received 06 June 2019; accepted in revised form 26 September 2019

**Abstract:** Essential oils (EOs) and hydrosol extract from plants always show a wide range of interesting biological activities. The present study was performed to assess for the first time, the chemical composition and some bioactivities of EO and hydrosol extract from *Daphne gnidium* L. growing in Algeria. The chemical characterization of EO and hydrosol extract was carried out by GC/FID and GC/MS analysis. The antioxidant activities were evaluated by DPPH radical scavenging and by FRAP tests. Also, antimicrobial screening of these extracts were performed using the agar disc diffusion test. Ninety-nine components in EO and thirty-two components in hydrosol extract accounting for 95.5 % and 81.4 % of the total extract composition were identified. The main constituents were carvone (12.7 %) followed by spathulenol (11.2 %) in EO, while the major compounds present in the hydrosol extract were carvone (10.9 %) and carvacrol (10.9 %). The results of antioxidant activity of hydrosol extract could be considered more interesting than EO. The data of the antimicrobial assays showed that all strains were sensitive to these extracts where EO displayed a very strong antibacterial activity mainly for *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* bacteria. Up to date, the current study is the first scientific report of antioxidant and antimicrobial activities as well as the chemical composition of the EO and hydrosol extract of Algerian *D. gnidium*. The obtained results could promote the potential of *D. gnidium* as a promising source of bioactive compounds with a possible application as new natural antioxidant and antimicrobial agents.

**Key words:** Essential oil, hydrosol, antioxidant, antimicrobial, *Daphne gnidium*.

### Introduction

Over thousands of years, many plants have been used to treat several diseases in human therapy and veterinary, in food, and countless other areas. During the last decade, there has been a growing interest in scientific studies on medicinal plants and their derived compounds. Indeed, plants are naturally rich sources of bioactive substances in-

cluding tannins, flavonoids, alkaloids, carbohydrates, terpenoids and steroids <sup>1</sup>. Essential oils (EOs) extracted by hydrodistillation from different parts of plant, are a complex chemical mixture of volatile compounds. They can be used for food applications, in cosmetic, and pharmaceutical industry <sup>2</sup>. Besides, during distillation process of aromatic plants, small amounts of EOs con-

\*Corresponding author (Chaouki Selles)  
E-mail: <selleschaouki@yahoo.fr>

stituents were lost in the water and many several hydrophilic components were water-soluble thereby forming a mixture called hydrosol. Considered for a long time as a waste product, hydrosols have been subject of only few investigations<sup>3-5</sup>. In recent years, they have gained increasing attention by scientists, investigating their antioxidant and antimicrobial capacities. Moreover, contrary to hydrosols, the chemical compositions of EOs species and their various biological activities has been widely studied. Otherwise, secondary metabolites, such as flavonoids and tannins isolated from plants and their interesting biological activities have been the focus of extensive research<sup>6, 7</sup>.

Thus, the search for natural antioxidants is extremely important and a lot of them are identified and now available for various applications<sup>8</sup>. Indeed, these pure bioactive compounds with various chemical structures possess a high ability to protect the body from damage caused by free radical induced oxidative stress<sup>9</sup>. Otherwise, extensive uses of antimicrobials have caused the emergence of multidrug-resistant strains. Therefore, in order to control infectious diseases and their financial burden impact on the health care system, great effort has been expended to search and develop new antibacterial agents. Indeed, EOs as a source of bioactive compounds with antimicrobial potential, are receiving growing attention<sup>10-12</sup>.

The north west of Algeria is one of the regions with the highest biodiversity in the Mediterranean area where many species have not yet been well studied.

The genus *Daphne* belonging to the family *Thymelaeaceae*, includes about 95 species occurring from central Asia throughout the Mediterranean region to northern Africa, especially to Algeria<sup>13</sup>. The Algerian Flora comprises of three species: *D. oleoides* Schreb, *D. gnidium* L, and *D. laureola* L. Locally known as 'lazzaz', *D. gnidium* is a perennial shrub that can reach 2 m in high, with darker leaves above and clearer and sticky below concentrated in the upper parts of stems<sup>14</sup>.

Although Thymelaeaceous plants have long been recognized for their toxicity, several *Daphne* spe-

cies have also been used to treat a wide range of disorders such as arthritis, dysentery, diarrhea, hemorrhoids and gout and also frequently used for wound healing and reduction of blood sugar<sup>15, 16</sup>.

*D. gnidium* L. has been used for centuries in the traditional medicinal practices of many countries to treat various ailments. In Spain, the bark in the form of necklaces is used in veterinary to repel insects and to facilitate the expulsion of the placenta after birth<sup>17</sup>. Traditionally, its dried bark has been used as a draconian purgative to treat constipation and toothache.

Externally used, *Daphne* has served to get rid of furuncles and for drying wounds, in addition to the killing of hair lice or ticks in animals while stem and leaf decoctions are applied in hair washing and as hair tonic<sup>18</sup>. Despite their proven toxicity, members of the *Daphne* genus have been the subject of numerous phytochemical studies in the last years where different classes of natural products have been isolated from these species, including flavonoids, coumarins, and diterpenoids<sup>19</sup>.

Indeed, various pure compounds isolated from these plants showed antioxidant, antimicrobial, analgesic, anti-inflammatory, cytotoxic and anti-leucemic activities<sup>16, 19-21</sup>.

Otherwise, *D. gnidium* ethyl acetate leaf extract acts as an *in vitro* anti-inflammatory factor by inhibiting mice macrophage and lymphocyte activities<sup>22</sup>.

To the best of our knowledge, there is no report in the literature addressing the profile of *D. gnidium* essential oils and hydrosol extract. In this study, we performed for the first time, the chemical composition of the volatile extracts of *D. gnidium* aerial parts as well as their antioxidant and antimicrobial activities.

## Material and methods

### Plant material

About 5 kg of *D. gnidium* aerial parts (leaves and stems) were collected in February 2017 around Zelboun locality at about 90 km North West of Tlemcen, Algeria (914 m, 34°51'30.06"N; 1°25'1.17"E). Botanical authentication was accomplished by plant taxonomists in the "Labora-



tory of Ecology and Ecosystem Management" Tlemcen University (Algeria). Voucher specimen (DG.AA.022017) was deposited in our laboratory. Plant material was air-dried in the dark at room temperature away from dust until use.

#### Essential oil and hydrosol extract isolation

Air-dried aerial parts of *D. gnidium* (400 g) were submitted to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus for 5 hours according to the protocol recommended in the European Pharmacopoeia<sup>23</sup>. Hydrodistillation was performed in triplicate. The EOs were collected and dried over anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). For the preparation of the corresponding hydrosol extract, one liter of condensed water during hydrodistillation, is recovered and subjected three times to a liquid-liquid-extraction using 250 mL of diethyl ether. At room temperature, the organic layer was evaporated and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Both essential oil and hydrosol extract were stored at 4°C in waterproof amber glass vials until further analyses. Their yields were calculated in relation to the weight of the dry vegetable matter.

#### Assessment of antioxidant capacity

##### DPPH radical scavenging assay

This method is based on the measurement of the scavenging capacity of antioxidants towards the stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The radical scavenging ability of EO and hydrosol extract was measured essentially as described by C. Sánchez-Moreno<sup>24</sup> with minor modifications. Briefly, 50 µL of each extract at different concentrations was added to a 1950 µL DPPH methanolic solution (0.025 g.L<sup>-1</sup>). The obtained mixture was shaken vigorously and allowed to stand for 30 min in the dark at ambient temperature. Then, the absorbance of the resulting solution was measured against a blank solution at 517 nm using a UV/Visible spectrophotometer (OPTIZEN POP). Ascorbic acid was used as a positive control to compare the radical scavenging activity of extracts. The DPPH radical scavenging ability was estimated using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging rate (\%)} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100 \%$$

where A<sub>blank</sub> and A<sub>sample</sub> are the absorbance of the control (prepared as the same without the extract) and the extract, respectively. The scavenging activity on DPPH radical was expressed as IC<sub>50</sub>, which is the concentration of extract required to give a 50 % decrease of the absorbance. The IC<sub>50</sub> value was calculated by using linear regression analysis. Each experiment was conducted in triplicate.

##### Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay was carried out as described by M. Oyaizu<sup>25</sup> with slight modifications. Briefly, different amounts of extracts in 1 mL of methanol were mixed with phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 mol.L<sup>-1</sup>, pH 6.6) and potassium ferricyanide (2.5 mL, 1 %). The mixture was incubated at 50°C for 20 min. 2.5 mL of trichloroacetic acid (10 % (w/v), aqueous solution) was added to the mixture followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Finally, the upper layer of solution (2.5 mL) was mixed with distilled water (2.5 mL) and ferric chloride aqueous solution (0.5 mL, 0.1 % (w/v)). Then, the absorbance of the resulting solution was recorded against a blank solution at 700 nm using a UV/Visible spectrophotometer, OPTIZEN POP, Daejeon, South Korea and compared with ascorbic acid used as a positive control. The FRAP value was expressed as IC<sub>50</sub>, which is the concentration of extract required to reduce 50% of the initial concentration of ferric thiocyanate. Each experiment was carried out in triplicate.

#### Estimation of antimicrobial activity

##### Microbial strains and cultivation

Seven microorganism strains were selected to assess the antimicrobial activity of essential oils and hydrosol from *D. gnidium*, including four Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) and three Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603).

The antibacterial activities of EOs and hydro-

sol extract were carried out using the agar disc diffusion method<sup>26</sup>. The turbidity of the bacterial suspension was adjusted to 0.5 McFarland standards and the culture concentration was diluted to approximately  $10^7$  Colony Forming Unit per mL (CFU/mL). Using a cotton swab, each adjusted strain was inoculated on Mueller-Hinton agar plates. After drying, sterile filter paper disc of 6 mm in diameter (Sanofi Diagnostic Pasteur) were impregnated with 10  $\mu$ L of essential oil or hydrosol extract and placed on the agar surface. The plates were then incubated at 37°C during 24 h. After the incubation period, the diameter of inhibition zones were measured (mm). Growth inhibition was compared with the following standard antibiotics: Gentamicin (10  $\mu$ g/disc), Ciprofloxacin (5 mcg/disc) and Tobramycin (10 mcg/disc) that were used as positive controls.

Tests were performed in triplicate and the means were calculated.

#### **Determination of minimum inhibition concentration (MIC)**

MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent (EO or hydrosol extract) that completely inhibited the growth of microorganism after incubation. MIC was determined by the broth microdilution method using 96-well plates<sup>27</sup>. A successive dilution of  $\frac{1}{2}$  of each extract in the outer tubes of Müller-Hinton broth (Fluka Biochemika, Spain) is carried out by adding Tween 80 at a concentration of 1 % (v / v) to obtain a homogeneous mixture of EO or hydrosol extract and broth. Another solution was prepared with Müller-Hinton broth and Tween 80 with the same concentration of 1 %. This solution was used to complete the successive dilutions of the first solution which contain EO or hydrosol extract so that the concentration of Tween 80 remains the same at 1 % in the different prepared concentrations. Inocula of  $10^7$  CFU/mL were diluted by 1/100 to obtain a concentration of  $10^5$  CFU/mL. A volume of 180  $\mu$ L of the bacterial suspension at  $10^5$  CFU / mL was deposited inside the wells of the microplate. Then, 20  $\mu$ L of EO or hydrosol extract solution was added. The final concentration of Tween 80 is 0.1 % (v/v) in each well and the final concentrations of the EO or hydrosol extract ranged from 500-0.2  $\mu$ L/mL.

#### **Gas chromatography (GC) analysis**

GC analysis was carried out using PerkinElmer Clarus 600 Gas Chromatograph apparatus (Walton, MA, USA) equipped with a single injector and a dual flame ionization detection (FID) system. The apparatus was used for simultaneous sampling of two fused-silica capillary columns (60 m  $\times$  0.22 mm, film thickness 0.25  $\mu$ m) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). 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 temperature was maintained at 280°C. Split injection was conducted with a ratio split of (1/50), using helium as carrier gas (0.7 mL/min); injected volume of pure EO or hydrosol extract: 0.2  $\mu$ L.

#### **Gas chromatography-Mass spectrometry (GC/MS) analysis**

Samples were analyzed with a PerkinElmer TurboMass quadrupole analyzer, coupled to a PerkinElmer Autosystem XL. The apparatus was equipped with two fused-silica capillary columns Rtx-1 and Rtx-Wax. The oven temperature was programmed from 60 to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Helium was employed as carrier gas (0.7 mL/min). The following chromatographic conditions were used: Injected volume of pure EO or hydrosol extract, 0.2  $\mu$ L. Ion source temperature: 150°C, ionization energy (EI): 70 eV, EI mass spectra were acquired over the mass range 35 -350 Da (scan time: 1 s). Other GC conditions were the same as described previously except for the split mode that becomes 1/80.

#### **Component identification and quantification**

Identification of individual components was based (i) on the comparison of their GC retention indices (RI) on polar and non polar columns with those of authentic compounds or literature data<sup>28,29</sup> and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries and comparison of spectra with those of the library of the "Laboratoire Chimie des Produits Naturels" Corse University, Corte (France). Component quantification was carried out using peak normalization % abundances, integrating the FID response fac-

tors relative to tridecane (0.7 g/100 g) used as internal standard.

### Statistical analysis

The assays were conducted in triplicate and all tabulated results were presented as means  $\pm$  SD (Standard Deviation). The data were statistically analyzed by variance analysis (ANOVA) available in Excel with XLSTAT software.

## Results and discussion

### Essential oil and hydrosol extract isolation

EO and hydrosol extract from the aerial parts of *D.gnidium* extracted respectively, by hydro-distillation and liquid-liquid-extraction yielding (0.015  $\pm$  0.001 %) (w/w) of yellow essential oil and (0.018  $\pm$  0.001 %) (w/w) of dark yellowish oil. The total number of chemical components identified in EO and hydrosol extract from aerial parts was ninety-nine and thirty-two accounting for respectively 95.5 % and 81.4 % of the total extract composition (Table 1).

GC/MS analyses showed that oxygenated compounds dominated EO which is characterized by a high percentage of oxygenated monoterpenes (36.9 %), followed by oxygenated sesquiterpenes (23.2 %) and non terpenic oxygenated compounds (21.2 %).

GC/MS profile of the hydrosol extract showed only oxygenated compounds (81.4 %) dominated by monoterpenes (48.2 %) followed by non terpenic oxygenated compounds (26.7 %). However, hydrocarbons were found only in the EO at a percentage of 13.6 %. The main components from aerial parts essential oil were carvone (12.7 %) followed by spathulenol (11.2 %), carvacrol (6.9 %) and hexadecanoic acid (5.9 %). On the other hand, the main compounds present in the hydrosol extract, were carvone (10.9 %) and carvacrol (10.9 %) followed by hexadecanoic acid (6.5 %) and cuminaldehyde (5.6 %) while eugenol is at a lower percentage (4.6 %).

### Assessment of antioxidant capacity

The antioxidant activity of *D. gnidium* was evaluated by two simple, precise and complementary methods: the DPPH free radical scavenging and the FRAP assay. Ascorbic acid as a synthetic

antioxidant was used as the positive control.

In order to assess antioxidant activity of *D. gnidium* extracts, IC<sub>50</sub> values were calculated and results are shown in (Table 2). A lower IC<sub>50</sub> value corresponds to the higher radical scavenging activity.

In the DPPH assay, the purple radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) is reduced to pale yellow when accepting an electron or in the presence of free radical species. Thanks to its sensitivity to low concentrations and its short reaction time, this method has been extensively used for screening/measuring antioxidant activities of various compounds and complex samples<sup>30,31</sup>.

The FRAP assay measures the ability of antioxidants to reduce ferric ion (Fe<sup>3+</sup>) to ferrous ion (Fe<sup>2+</sup>) by donating electrons.

By comparing the IC<sub>50</sub> values from the two testing methods, EO showed antioxidant activity slightly lower than hydrosol extract. Otherwise, the results obtained for EO by the DPPH method did not differ from those obtained by the reducing power test but appear lower than that of ascorbic acid.

The results of antioxidant activity of *D. gnidium* hydrosol extract could be considered more interesting than essential oil (IC<sub>50</sub> values were 0.62  $\pm$  0.09 vs 1.14  $\pm$  0.15 mg/mL for DPPH assay and 0.42  $\pm$  0.01 vs 1.10  $\pm$  0.04 mg/mL for ferric-reducing capacity). The comparison of hydrosol extract with the ascorbic acid showed a ferric reducing power of hydrosol stronger than that of standard antioxidant while the hydrosol DPPH radical scavenging activity is about ten times lower than that of ascorbic acid (IC<sub>50</sub> values were 0.42  $\pm$  0.01 vs 0.91  $\pm$  0.03 mg/mL for FRAP assay and 0.62  $\pm$  0.09 vs 0.06  $\pm$  0.02 mg/mL for DPPH assay, respectively).

The antioxidant activity was related to the class of compounds present in both EO and hydrosol extract which are dominated by oxygenated monoterpenes (36.9 % and 48.2 %, respectively). It was reported that the monoterpenes and sesquiterpenes possesses antioxidant properties<sup>32</sup>. Indeed, carvone exhibited effective and powerful antioxidant activity<sup>33</sup>.

However, as a polar mixture, hydrosol extract display a high content of only oxygenated com-

**Table 1. Chemical compositions of essential oil and hydrosol extract of aerial parts of *D. gnidium***

No.	Compound <sup>a</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Essential oil <sup>e</sup>	Hydrosol <sup>e</sup>
1	3-Methyl-3-pentanol <sup>6</sup>	757	793	-	-	3.6
2	Benzaldehyde <sup>6</sup>	929	929	1530	0.1	-
3	$\beta$ -Pinene <sup>1</sup>	970	969	1017	tr	-
4	Myrcene <sup>1</sup>	987	979	1158	tr	-
5	p-Cymene <sup>1</sup>	1011	1011	1261	0.3	-
6	Benzyl alcohol <sup>6</sup>	1011	1013	1877	-	0.9
7	Limonene <sup>1</sup>	1020	1020	1194	0.2	-
8	<i>trans</i> -Sabinene hydrate <sup>2</sup>	1051	1056	1449	tr	-
9	<i>trans</i> -linalol oxide <sup>2</sup>	1057	1061	1435	0.1	0.4
10	Octanol <sup>6</sup>	1058	1064	1549	tr	-
11	6-Methyl-3,5-heptadien-2-one <sup>6</sup>	1074	1080	-	-	0.8
12	Nonanal <sup>6</sup>	1083	1081	1381	0.2	0.6
13	Linalool <sup>2</sup>	1081	1084	1545	0.7	2.9
14	Phenyl ethanol <sup>6</sup>	1086	1098	1906	-	0.6
15	Phenyl acetaldehyde <sup>6</sup>	1112	1111	1592	0.3	-
16	Camphor <sup>2</sup>	1123	1122	1503	0.5	tr
17	Isophorone <sup>2</sup>	1124	1124	1570	0.1	-
18	Cryptone <sup>2</sup>	1157	1158	1662	0.9	-
19	Terpinen-4-ol <sup>2</sup>	1161	1162	1657	0.8	-
20	$\alpha$ -Terpineol <sup>2</sup>	1179	1176	1700	-	2.6
21	Estragol <sup>2</sup>	1176	1178	1678	2.1	0.9
22	Decanal <sup>6</sup>	1185	1184	1498	0.4	0.9
23	<i>trans</i> -Carveol <sup>2</sup>	1200	1197	1820	0.2	-
24	Nerol <sup>2</sup>	1210	1205	1799	0.6	-
25	Cuminaldehyde <sup>2</sup>	1217	1213	1777	0.6	5.6
26	Carvone <sup>2</sup>	1222	1222	1756	12.7	10.9
27	Geraniol <sup>2</sup>	1232	1232	1845	0.1	-
28	E-Myrtenol <sup>2</sup>	1241	1234	1864	0.1	-
29	(E)-2-Decanal <sup>6</sup>	1248	1246	1662	0.2	-
30	Phellandral <sup>2</sup>	1251	1253	1708	0.6	-
31	$\alpha$ -Terpinen-7-ol <sup>2</sup>	1258	1260	1771	0.3	0.6
32	E-anethole <sup>2</sup>	1264	1268	1801	3.8	3.1
33	p-Cymen-7-ol <sup>2</sup>	1271	1275	2091	-	1.2
34	Thymol <sup>2</sup>	1266	1278	2167	3.6	1.1
35	Undecan-2-one <sup>6</sup>	1273	1279	1592	0.6	0.8
36	Undecan-2-ol <sup>6</sup>	1284	1281	1711	2.6	-
37	Carvacrol <sup>2</sup>	1278	1288	2219	6.9	10.9
38	Tridecane <sup>5</sup>	1300	1302	1352	0.4	-
39	Piperitenone <sup>2</sup>	1318	1317	1318	-	0.6
40	Eugenol <sup>2</sup>	1330	1324	2164	0.3	4.6
41	Piperitenone oxide <sup>2</sup>	1333	1343	1927	3.3	-
42	Geranyl acetate <sup>2</sup>	1362	1352	1750	0.2	-
43	$\beta$ -Damascenone <sup>2</sup>	1362	1367	1780	0.7	2.9

table 1. (continued).

No.	Compound <sup>a</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Essential oil <sup>e</sup>	Hydrosol <sup>e</sup>
44	Methyl eugenol <sup>2</sup>	1367	1373	2009	0.5	0.6
45	$\alpha$ -Copaene <sup>3</sup>	1379	1376	1520	0.6	-
46	Nepetalactone <sup>2</sup>	1380	1382	1970	2.2	-
47	$\beta$ -Elemene <sup>3</sup>	1389	1387	1565	0.6	-
48	Dodecanal <sup>6</sup>	1395	1398	1707	0.3	-
49	Isocaryophyllene <sup>3</sup>	1409	1401	1558	0.5	-
50	Neryl acetone <sup>2</sup>	1410	1409	1826	0.7	1.4
51	<i>trans</i> -caryophyllene <sup>3</sup>	1424	1420	1609	0.8	-
52	Geranyl acetone <sup>2</sup>	1430	1431	1860	0.6	-
53	(E)- $\beta$ -farnesene <sup>3</sup>	1446	1445	1651	0.3	-
54	Aromadendrene <sup>3</sup>	1451	1448	1626	0.4	-
55	Allo-aromadendrene <sup>3</sup>	1462	1456	1631	0.7	-
56	Damascone <sup>2</sup>	1466	1460	1809	0.2	-
57	$\alpha$ -Curcumene <sup>3</sup>	1471	1472	1772	2.1	-
58	$\gamma$ -Curcumene <sup>3</sup>	1474	1476	1685	0.2	-
59	$\beta$ -Ionone <sup>2</sup>	1476	1478	1936	-	2.9
60	D-Germacrene <sup>3</sup>	1479	1480	1646	0.4	-
61	$\beta$ -Selinene <sup>3</sup>	1483	1485	1724	0.2	-
62	Tridecanal <sup>6</sup>	1494	1493	1819	1.3	-
63	Dihydroactinidiolide <sup>6</sup>	1479	1499	-	-	2.8
64	$\beta$ -Bisabolene <sup>3</sup>	1500	1509	1725	0.4	-
65	$\alpha$ -Bisabolene <sup>3</sup>	1518	1514	1767	0.5	-
66	$\delta$ -Cadinene <sup>3</sup>	1516	1516	1774	0.2	-
67	$\alpha$ -Cadinene <sup>3</sup>	1535	1528	1777	0.3	-
68	Calamenene <sup>3</sup>	1534	1539	1823	1.2	-
69	Nerolidol <sup>4</sup>	1546	1544	2045	0.4	-
70	$\alpha$ -Copaen-11-ol <sup>4</sup>	1547	1552	2104	0.2	-
71	<i>cis</i> -3-hexenyl benzoate <sup>6</sup>	1554	1554	2088	0.4	2.4
72	Spathulenol <sup>4</sup>	1568	1570	2093	11.2	0.7
73	Caryophyllene oxide <sup>4</sup>	1576	1580	1981	0.7	2.2
74	Globulol <sup>4</sup>	1580	1582	2066	0.3	-
75	Viridiflorol <sup>4</sup>	1591	1589	2085	0.4	-
76	Humulene epoxide II <sup>4</sup>	1601	1594	2034	0.6	-
77	Tetradecanal <sup>6</sup>	1592	1598	1927	0.9	-
78	Cubenol <sup>4</sup>	1611	1611	2074	tr	-
79	Aromadendrene oxide II <sup>4</sup>	1617	1617	1997	0.1	tr
80	Epicubenol <sup>4</sup>	1624	1624	2060	0.4	-
81	Isospathulenol <sup>4</sup>	1625	1625	2134	0.6	-
82	$\tau$ -Cadinol <sup>4</sup>	1632	1628	2157	0.5	-
83	Ar-turmerone <sup>4</sup>	1639	1641	2266	2.4	1.4
84	$\beta$ -Eudesmol <sup>4</sup>	1644	1645	2241	0.6	-
85	$\alpha$ -Cadinol <sup>4</sup>	1645	1650	2236	0.6	-
86	$\alpha$ -Eudesmol <sup>4</sup>	1653	1654	2227	0.2	-
87	(Z,Z)-Farnesal <sup>4</sup>	1655	1663	2163	0.7	-

table 1. (continued).

No.	Compound <sup>a</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>b</sup>	RI <sub>a</sub> <sup>c</sup>	RI <sub>p</sub> <sup>d</sup>	Essential oil <sup>e</sup>	Hydrosol <sup>e</sup>
88	2-Oplopenol <sup>4</sup>	1670	1668	2283	0.2	-
89	$\alpha$ -Bisabolol <sup>4</sup>	1673	1674	2206	0.3	tr
90	(Z,E) Farnesol <sup>4</sup>	1687	1687	2307	0.2	-
91	Heptadecane <sup>5</sup>	1700	1707	1698	0.2	-
92	Benzyl benzoate <sup>6</sup>	1733	1739	2593	-	1.8
93	Tetradecanoic acid <sup>6</sup>	1748	1739	2658	0.4	-
94	Hexadecanal <sup>6</sup>	1795	1796	2139	0.2	-
95	Phytone <sup>7</sup>	1817	1821	2142	1.6	2.2
96	(Z,Z)-Farnesyl acetone <sup>4</sup>	1844	1841	2277	0.3	-
97	Pentadecanoic acid <sup>6</sup>	1848	1847	2787	0.1	-
98	(E,E)-farnesyl acetone <sup>4</sup>	1895	1892	2366	0.7	-
99	Hexadecanoic acid <sup>6</sup>	1968	1964	2867	5.9	6.5
100	Octadecanal <sup>6</sup>	1995	1990	2349	0.3	-
101	Geranyl linalool <sup>4</sup>	2010	1999	2533	0.2	-
102	Octadecanol <sup>6</sup>	2070	2061	2591	0.2	-
103	Octadecanoic acid <sup>6</sup>	2103	2105	2607	0.3	-
104	Phytol <sup>7</sup>	2104	2116	2645	0.4	-
105	Dicosane <sup>5</sup>	2200	2195	2188	0.3	-
106	Tricosane <sup>5</sup>	2300	2296	2317	0.6	-
107	Tetracosane <sup>5</sup>	2400	2395	2397	0.4	-
108	Pentacosane <sup>5</sup>	2500	2499	2495	1.3	-
109	Octacosane <sup>5</sup>	2600	2595	-	0.5	-
	Total identification %				<b>95.5</b>	<b>81.4</b>
	<b>Hydrocarbons compounds</b>				<b>13.6</b>	-
	Hydrocarbons monoterpenes <sup>1</sup>				0.5	-
	Hydrocarbons sesquiterpenes <sup>3</sup>				9.4	-
	Non terpenic hydrocarbons <sup>5</sup>				3.7	-
	<b>Oxygenated compounds</b>				<b>81.9</b>	<b>81.4</b>
	Oxygenated monoterpenes <sup>2</sup>				36.9	48.2
	Oxygenated sesquiterpenes <sup>4</sup>				23.2	6.5
	Oxygenated diterpenes <sup>7</sup>				0.6	-
	Non terpenic oxygenated <sup>6</sup>				21.2	26.7

<sup>a</sup>Elution order on apolar column (Rtx-1)<sup>b</sup> Retention indices of literature on the apolar column<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 given on the apolar column

tr, trace (&lt; 0.05 %)

RI, retention indices

Bold values show the major components

pounds (81.4 %). It is well known that alcohols and phenolic components with high hydrogen-donating capacity towards the DPPH radical, ex-

hibited significant antioxidant properties <sup>34-36</sup>.

Indeed, It was shown that carvacrol presented a strong antioxidant potential due to the presence

**Table 2. DPPH and FRAP radical-scavenging activities (IC<sub>50</sub>) of essential oil and hydrosol extract from aerial parts of *D. gnidium***

Extract	DPPH (IC <sub>50</sub> mg/mL)	FRAP (IC <sub>50</sub> mg/mL)
Essential oil	1.14 ± 0.15	1.10 ± 0.04
Hydrosol extract	0.62 ± 0.09	0.42 ± 0.01
Ascorbic acid	0.06 ± 0.02	0.91 ± 0.09

IC<sub>50</sub>: Inhibition Concentration 50 %

**Table 3. Antimicrobial activities of aerial parts of *Gnidium* essential oil and hydrosol extract expressed by the diameter inhibition zones and MIC values (µL/mL)**

Strains	Essential oil		Hydrosol extract		Standard antibiotics		
	DD	MIC	DD	MIC	CN	CIP	TOB
<b>Gram-positive bacteria</b>							
<i>Staphylococcus aureus</i>	30±0.00	<0.24	11±0.00	31.25±0.02	16	30	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	14±0.01	3.90±0.01	09±0.02	62.5±0.01	-	14	-
<i>Bacillus cereus</i>	27±0.06	0.97±0.01	11±0.00	15.62±0.03	24	27	12
<i>Bacillus subtilis</i>	28±0.00	0.48±0.00	14±0.01	3.90±0.00	-	25	16
<b>Gram-negative bacteria</b>							
<i>Escherichia coli</i>	36±0.01	<0.24	13±0.00	7.81±0.01	21	33	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31±0.00	<0.24	12±0.01	7.81±0.01	19	33	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25±0.02	1.95±0.00	08±0.02	15.62±0.00	21	28	15

DD: Diameter of inhibition zone (mm) including disc diameter of 6 mm,

MIC: Minimal inhibitory concentration (µL/mL).

CN: Gentamicin (10 µg/disc)

CIP: Ciprofloxacin (5 mcg/disc)

TOB: Tobramycin (10 mcg/disc)

-: not active

of hydroxyl group linked to aromatic ring of carvacrol molecule<sup>37</sup>. Moreover, the antioxidant activity of EOs or/and hydrosol extract may be related to all compounds. Therefore, synergism and antagonism studies must be developed<sup>38</sup>.

#### Estimation of antimicrobial activity

The agar disc-diffusion method was used to evaluate antimicrobial activities of *D. gnidium* EO and hydrosol extract. The results showed that the studied extracts have contributed to the inhibition of all tested strains to varying degrees (Table 3). Essential oil has a very interesting antibacterial activity against the tested bacteria while hydrosol extract showed a moderate one. The essential oil

was shown to have antimicrobial activities against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Indeed in the presence of the EO, *E. coli* as a food related bacteria<sup>39</sup>, *P. aeruginosa* and *S. aureus* two pathogens responsible for a number of nosocomial infections<sup>40</sup>, were the most sensitive microorganisms with important inhibition diameters of respectively 36, 31 and 30 mm. However, the EO effect was slightly less pronounced against *B. subtilis* (28 mm), *B. cereus* (27 mm) and *K. pneumoniae* (25 mm) while *E. faecalis* remains the most resistant bacteria, in comparison with the other strains, with an inhibition diameter of 14 mm. The MICs values of Eos against the three bacteria *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S.*

*aureus* mentioned above were < 0.24 µL/mL.

The essential oil was more effective against all tested strains than Gentamicin and Tobramycin but similar to Ciprofloxacin used as conventional antibiotics.

Due to the complexity of the EO chemical composition, it becomes difficult to relate its antimicrobial activity to a specific component. The most abundant class of compounds in essential oils are terpenes which are known to be active against a wide range of microorganisms<sup>41</sup>. However, several studies reported that the major compounds are responsible for this existing activity. Our results may be explained by the occurrence of several bioactive components reported in the literature such as carvone who has potential uses for inhibiting the growth of bacteria<sup>42</sup>. Furthermore, EO containing spathulenol as a major compound were shown to exhibit antimicrobial activities against a variety of bacteria<sup>43</sup>. Otherwise, it was also reported that the antimicrobial activity may not rely exclusively on the major compounds, but it is due to a possible synergistic effect between the different constituents of the oil<sup>44</sup>.

## Conclusions

Gas chromatographic analysis revealed that es-

sential oil is characterized by the abundance of oxygenated monoterpenes (36.9 %) followed by sesquiterpenes (23.2 %) while hydrosol extract is dominated only by oxygenated compounds (81.4 %). The main bioactive compounds were carvone (12.7 %) followed by spathulenol (11.2 %) in the oil while hydrosol extract is rich in carvone and carvacrol at 10.9 % each.

The present findings show that *D. gnidium* aerial parts EO and hydrosol extract contains biologically potent therapeutic phytochemical with moderate antioxidant and very strong antibacterial activities.

The interesting activities of *D. gnidium* reflect its capacity to be used as a natural preservative in food, pharmaceutical industry and cosmetics.

Further studies should be performed in order to understand well the main mechanism of these activities and to determine which of the isolated compounds may be responsible for these activities.

## Acknowledgements

Corresponding author is sincerely grateful to CPN (Corse University, France) and LAMAABE (Tlemcen University, Algeria) laboratories for assistance and their material support.

## References

1. **Stankovic, M.S., Radić, Z.S., Blanco-Salas, J., Vázquez-Pardo, F.M. and Ruiz-Téllez, T. (2017).** Screening of selected species from Spanish flora as a source of bioactive substances. *Ind. crops prod.* 95: 493-501.
2. **Smigielski, K., Prusinowska, R., Stobiecka, A., Kunicka-Styczyńska, A. and Gruska, R. (2018).** Biological Properties and Chemical Composition of Essential Oils from Flowers and Aerial Parts of Lavender (*Lavandula angustifolia*). *J. Essent. Oil Bearing Plants.* 21(5): 1303-1314.
3. **Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdic, O., Bayram, O. and Yetim, H. (2011).** Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella Typhimurium* on fresh cut carrots and apples. *Int. J. Food Microbiol.* 148(1): 30-35.
4. **Lemouchi, R., Selles, C., Dib, M.E.A., Benmansour, N., Allal, A., Tabti, B. and Ouali, K. (2017).** Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil and Hydrosol Extract Obtained by Hydrodistillation (HY) and Liquid-Liquid Extraction (LLE) of *Psoralea bituminosa*. *J. Herbs spices Med. Plants.* 23(4): 299-307.
5. **Djabou, N., Dib, M.E.A., Tabti, B., Costa, J. and Muselli, A. (2014).** Chemical composition and antioxidant activity of hydrosol extracts obtained by liquid-liquid extraction (LLE) of *Daucus muricatus* L. *J. Essent. Oil Res.* 26(6): 393-399.
6. **Nagula, R.L. and Wairkar, S. (2019).** Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. *J. Control. Release.* 296: 190-201.
7. **Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R. Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., and**



- Hoste, H. (2015).** Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int. J. Parasitol. : Drugs Drug Resist.* 5(3): 127-134.
8. **Shanty, A.A. and Mohanan, P.V. (2018).** Heterocyclic Schiff bases as non toxic antioxidants: Solvent effect, structure activity relationship and mechanism of action. *Spectroc. Acta A.* 192: 181-187.
9. **Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989).** Free radicals in biology and medicine. 2th edn. Oxford. Press: Clarendon.
10. **Xiang, F., Bai, J., Tan, X., Chen, T., Yang, W. and He, F. (2018).** Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* Levl. et Van. var. *argyi* cv. Qiai. *Ind. Crops Prod.* 125: 582-587.
11. **Wang, Y.-H. and Yu, X.-Y. (2018).** Biological Activities and Chemical Compositions of Volatile Oil and Essential Oil from the Leaves of *Blumea balsamifera*. *J. Essent. Oil Bearing Plants.* 21(6): 1511-1531.
12. **Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcus, V., Olah, N.K. and Mathe, E. (2018).** An overview of natural antimicrobials role in food. *Eur. J. Med. Chem.* 143: 922-935.
13. **SovrliC, M.M. and Manojlovic, N.T. (2017).** Plants from the genus *Daphne*: A Review of its traditional uses, Phytochemistry, Biological and Pharmacological Activity. *Ser. J. Exp. Clin. Res.* 18(1): 69-80.
14. **Quézel, P., and Santa, S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II C.N.R.S. edn.. Paris, France.
15. **Rehman, K., Khan, M.A., Ullah, Z. and Chaudhary, H.J. (2015).** An ethno botanical perspective of traditional medicinal plants from the Khattak tribe of Chonthra Karak, Pakistan. *J. Ethnopharmacol.* 165: 251-259.
16. **Balkan, I.A., Taskin, T., Dogan, H.T., Deniz, I., Akaydin, G. and Yesilada, E. (2017).** A comparative investigation on the in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potentials of subextracts from the aerial parts of *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *Oleoides*. *Ind. Crops Prod.* 95: 695-703.
17. **Benítez, G., González-Tejero, M.R. and Molero-Mesa, J. (2012).** Knowledge of ethnoveterinary medicine in the Province of Granada, Andalusia, Spain. *J. Ethnopharmacol.* 139(2): 429-439.
18. **Merzouki, A., Ed-Derfoufi, F. and Mesa, J.M. (2000).** Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). *Fitoterapia.* 71(3): 278-307.
19. **Cottigli, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Caus, M., Pompei, R. and Bonsignore, L. (2001).** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine.* 8(4): 302-305.
20. **Huang, S.Z., Zhang, X.J., Li, X.Y., Kong, L.M., Jiang, H.Z., Ma, Q.Y., Liu, Y.Q., Hu, J.M., Zheng, Y.T. and Li, Y. (2012).** Daphnane-type diterpene esters with cytotoxic and anti-HIV-1 activities from *Daphne acutiloba* Rehd. *Phytochemistry.* 75: 99-107.
21. **Khodadadian, Z., Hassanpour-Ezatti, M., Mousavi, S.Z. and Asgarpanah, J. (2016).** Analgesic and anti-inflammatory potential of aerial parts of the *Daphne mucronata* Royle extract in mice: Opioid-independent action. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6(3): 198-201.
22. **Harizi, H., Chaabane, F., Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2011).** Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. *Cell. Immunol.* 267(2): 94-101.
23. **EDQM (Concil of Europe). (1997).** European pharmacopoeia. 3rd edn.. Strasbourg, France.
24. **Sánchez-Moreno, C. (2002).** Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8(3): 121-137.
25. **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *Jap. J. Nutr. Diet.* 44(6): 307-315.
26. **CLSI-Clinical Labotary Standards Institute, (2009).** Quality Manual, Document M07-A6,

- Wayne, PA, USA.
27. **Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R.E. (2008).** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. protoc.* 3: 163-175.
  28. **König, W.A., Hochmuth, D.H. and Joulain, D. (2001).** Terpenoids and related constituents of essential oils (Library of Mass Finder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry: Hamburg). Germany.
  29. **NIST : National Institute of Standards and Technology. (2008).** NIST Standard Reference Database (<http://webbook.nist.gov/chemistry>). Gaithersburg MD.
  30. **Li, J.-E., Fan, S.-T., Qiu, Z.-H., Li, C. and Nie, S.-P. (2015).** Total flavonoids content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from *Mosla chinensis Maxim.* cv. Jiangxiangru. *LWT - Food Sci. Technol.* 64(2): 1022-1027.
  31. **Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S. and Lima, J.L.F.C. (2008).** Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta.* 613(1): 1-19.
  32. **Amorati, R., Foti, M.C. and Valgimigli, L. (2013).** Antioxidant activity of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 61(46): 10835-10847.
  33. **Elmasta<sup>o</sup>, M., Dermirtas, I., Isildak, O., and Aboul Enein, H. Y. (2006).** Antioxidant Activity of S-Carvone Isolated from Spearmint (*Mentha Spicata* L. Fam Lamiaceae). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29(10): 1465-1475.
  34. **Shen, X., Chen, W., Zheng, Y., Lei, X., Tang, M., Wang, H. and Song, F. (2017).** Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of *Areca catechu* L. and *Cocos nucifera* L. *Ind. Crops prod.* 96: 110-119.
  35. **Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S. and Sagratini, G. (2017).** Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food Chem.* 221: 689-697.
  36. **Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(7): 933-956.
  37. **Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (1994).** Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* 32(1): 31-36.
  38. **Miguel, M.G. (2010).** Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules.* 15(12): 9252-9287.
  39. **Vásquez-García, A., de Oliveira, A.P.S.C., Mejia-Ballesteros, J.E., de Godoy, S.H.S., Barbieri, E., de Sousa, R.L.M. and Fernandes, A.M. (2019).** *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. *Aquaculture.* 504: 158-163.
  40. **Aitboulahsen, M., Zantar, S., Amin, L., Mohammed, E., Abdelhay, A., Chairi, H., Bakkali, M. and Hassani Zerrouk, M. (2018).** Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Against Pathogens Isolated from Food, Crops and Hospitals in Morocco. *J. Essent. Oil Bearing Plants.* 21(6): 1450-1459.
  41. **Houicher, A., Hamdi, M., Hechachna, H. and Özogul, F. (2018).** Chemical composition and antifungal activity of *Anacyclus valentinus* essential oil from Algeria. *Food Biosci.* 25: 28-31.
  42. **Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G. and von Wright, A. (1998).** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46(9): 3590-3595.
  43. **Tan, N., Satana, D., Sen, B., Tan, E., Altan, H.B., Demirci, B. and Uzun, M. (2016).** Antimycobacterial and antifungal activities of selected four *Salvia* species. *Rec. Nat. Prod.* 10(5): 593.
  44. **Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R.L. (2012).** Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3: 12-24.

## **Résumé :**

La présente étude consiste à valoriser deux plantes sous utilisées de la région de Tlemcen, à savoir *Atractylis humilis* (Asteracées) et *Daphne gnidium* (Thymelaeaceae). Après un examen phytochimique, leurs compositions chimiques en huiles essentielles et en hydrolats ont été identifiées par CPG et CPG/SM. Par la suite, leurs activités antioxydantes par deux méthodes (FRAP et DPPH) ont été investiguées. En fin, La partie restante est consacrée à l'activité antimicrobienne des différents extraits sur plusieurs souches où le résultat obtenu a révélé une activité antimicrobienne modérée.

**Mots clés :** huile essentielle, hydrolat, composés phénoliques, activité antioxydante et activité antimicrobienne.

## **Abstract :**

The present study consists in enhancing two underused plants from the Tlemcen region, namely *Atractylis humilis* (Asteraceae) and *Daphne gnidium* (Thymelaeaceae). After a preliminary phytochemical screening, their chemical compositions in essential oils and hydrosols were identified by CPG and CPG / MS. Subsequently, their antioxidant activities by two methods (FRAP and DPPH) were investigated. Finally, the remaining part is devoted to the antimicrobial activity of the various extracts on several strains where the obtained result revealed moderate antimicrobial activity.

**Key words:** essential oil, hydrosol, phenolic compounds, antioxidant activity and antimicrobial activity

## **ملخص :**

تتمثل الدراسة الحالية في تمييز نباتين غير مستخدمين بشكل كاف من منطقة تلمسان، وهما *Atractylis humilis* (Asteraceae) و *Daphne gnidium* (Thymelaeaceae). بعد الفحص الكيميائي النباتي ، تم تحديد التركيبات الكيميائية للزيوت وارتباطا والهيدروسولات بواسطة CPG و CPG / SM. بعد ذلك، تم التحقيق في أنشطتها المضادة للأكسدة بطريقتين FRAP و DPPH أخيراً، تم تخصيص الجزء المتبقي للنشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات المختلفة على العديد من السلالات حيث أظهرت النتيجة التي تم الحصول عليها نشاطاً ضد *E. coli* و *S. aureus*.

**الكلمات المفتاحية :** زيت عطري ، هيدروسول ، مركبات فينولية ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للميكروبات