

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCCEN



Faculté des Sciences - Département de Chimie

Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives
(LASNABIO)



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat de 3ème cycle en Chimie

Option : Chimie Bio-Organique & Thérapeutique

Thème

**COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES
EXTRAITS DE CINQ PLANTES AROMATIQUES ET
MEDICINALES DE L'OUEST D'ALGERIE**

Présentée par : **CHIKHI ILYAS**

Soutenue le 30/10/2013 devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------|---|--------------|
| GHALEM Saïd | Professeur, Université de Tlemcen, Algérie | Président |
| TABTI Boufeldja | Professeur, Université de Tlemcen, Algérie | Examineur |
| AINAD TABET Driss | Professeur, Université de Sidi Bel Abbès, Algérie | Examineur |
| BENNACEUR Malika | Professeur, Université d'Oran, Algérie | Examinatrice |
| BELOUATEK Aïssa | Professeur, Centre Universitaire de Relizane, Algérie | Examineur |
| DIB Mohamed El Amine | M.C (A), Université de Tlemcen, Algérie | Invité |
| ALLALI Hocine | Professeur, Université de Tlemcen, Algérie | Encadreur |

Année Universitaire 2013/2014

A mes parents

A mes frères et ma sœur,

A ma famille,

A mes ami(e)s

A toutes les mains qui m'ont été tendues...

Remerciements

*J'*adresse en premier lieu mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur ALLALI Hocine, pour avoir dirigé cette thèse. J'ai apprécié la liberté qu'il m'a laissée dans la conduite de mes recherches. Il m'a témoigné une confiance presque illimitée. Sa confiance, son soutien, sa disponibilité sans limite et ses conseils avisés m'ont permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions. J'ai eu énormément de plaisir à travailler sous sa tutelle.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail, et plus particulièrement, Monsieur GHALEM Saïd qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse de doctorat. Je suis très reconnaissant envers Mme BENNACEUR Malika et messieurs TABTI Boufeldja, AINAD TABET Driss, BELOUATEK Aïssa et DIB Mohamed El Amine d'avoir accepté de participer au jury et d'examiner ce travail.

*J'*aimerais encore exprimer ma gratitude et mes remerciements à monsieur le Professeur TABTI Boufeldja pour ses conseils éclairés et pour son aide durant toutes mes années d'études.

Ces travaux de recherche ont été effectués au Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (LASNABIO), sous la direction du Professeur GHALEM Saïd. À ce titre, je tiens à le remercier pour m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de son groupe de recherche et pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien cette thèse. Je remercie également tous les membres et les thésards du laboratoire pour leur soutien et leur bonne humeur.

Je voudrais ensuite exprimer toute ma gratitude et mes vifs remerciements au Dr. DIB Mohamed El Amine pour ses nombreux conseils. Ses avis et recommandations toujours avisés ont fortement contribué au succès de ces travaux.

Je tiens particulièrement à remercier le professeur Jean Costa pour m'avoir accueilli dans son laboratoire Chimie de produits Naturels (CPN) et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens matériels permettant la réussite de mon projet de thèse. Mes remerciements chaleureux vont au Dr. MUSELLI Alain pour son aide précieuse et ses conseils. Je voudrais d'ailleurs dire un grand merci à l'ensemble de l'équipe du laboratoire pour leur accueil chaleureux.

*M*es chaleureux remerciements vont également à Messieurs BENABADJI Noury et HASSANI Faiçal pour ses conseils et ses aides si précieuses pour l'échantillonnage et l'identification des plantes.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance aux personnes qui m'ont apportées des appuis scientifiques, qu'il s'agisse de conseils ou d'informations, je pense notamment à ABBAS Abdelhafidh, SELLES Chaouki, MERGHACHE Salima et DJABOU Nassim. Merci également à ZERIOUH Meriem, MEJDOUB Houria, MERGHACHE Djamila et HALLA Noureddine pour les différents échanges sur les activités biologiques.

Je remercie également mes parents mes frères et ma sœur et tous mes amis pour leurs encouragements et leur soutien permanent.

Merci à toutes et à tous....

Liste des Tableaux

- Tableau 1:** Description de *P. sordidum* L.
- Tableau 2:** Description de *P. saxatile* (L.) Cass.
- Tableau 3:** Description de *C. villosa* subsp. *intermedia*
- Tableau 4:** Description de l'*I. planifolia* (Mill)
- Tableau 5:** Description de l'*A. halimus*
- Tableau 6:** Nomenclature des terpènes
- Tableau 7:** Variabilité des paramètres du test au radical libre DPPH
- Tableau 8:** Etude de la variabilité géographique de *P. sordidum* L.
- Tableau 9:** Etude de la variabilité géographique de *P. saxatile*
- Tableau 10:** Etude de la variabilité géographique de *C. villosa* subsp. *intermedia*
- Tableau 11:** Région d'étude de l'*I. planifolia*
- Tableau 12:** Région d'étude de l'*A. halimus*
- Tableau 13:** Apport de la chromatographie flash à l'identification des constituants d'huiles essentielles
- Tableau 14:** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. sordidum*
- Tableau 15:** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. saxatile*
- Tableau 16:** Compositions chimiques des huiles essentielles de *P. sordidum* L. de diverses localités de l'ouest d'Algérie.
- Tableau 17:** Compositions chimiques des huiles essentielles de *P. saxatile* de diverses localités de l'ouest d'Algérie
- Tableau 18:** Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. sordidum* L. en fonction du stade de développement de la plante.
- Tableau 19:** Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. Saxatile* en fonction du stade de développement de la plante.
- Tableau 20:** Composition chimique de l'H.E des parties aériennes de *C. villosa*.
- Tableau 21:** Composition chimique de l'H.E des parties aériennes d'*I. planifolia*.
- Tableau 22:** Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes feuilles et tiges de *A. halimus*.
- Tableau 23:** Activités antibactériennes des huiles essentielles
- Tableau 24:** Test réduction du radical DPPH° par les huiles essentielles.
- Tableau 25:** Test de réduction du Fer par huiles essentielles.
- Tableau 26:** Criblage phytochimique de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*
- Tableau 27:** Résultats du dosage des polyphénols totaux de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*.

Liste des Figures

- Fig.1:** *Phagnalon sordidum* L.
Fig.2: *Phagnalon sordidum* L. (fleurs)
Fig.3: Acide bétulinique
Fig.4: Lupane
Fig.5: β -D Glucopyranoside
Fig.6: 1-*O*- β -glucopyranosyl-2-(3,3-diméthylallyl) hydroquinone
Fig.7: 1-*O*- β -glucopyranosyl-2-(3-hydroxyméthyl-3-méthylallyl) hydroquinone
Fig.8: Acide chlorogénique
Fig.9: Acide méthyle chlorogénique
Fig.10: 3,5-di-*O*-cafféoylquinique méthyle ester
Fig.11: 3,5-di-*O*-acide cafféoylquinique
Fig.12: Apigénine
Fig.13: Lutéoline-4-glucopyranoside
Fig.14: Lutéonile
Fig.15: Acide caféique
Fig.16: *P. rupestre* L.
Fig.17: *P. rupestre* L. (fleurs)
Fig.18: 7,7-bis-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)-8,8-dihydroxyméthyl-tétrahydrofurane-4-*O*- β -gluco pyranoside
Fig.19: Prénylhydroquinone glycoside 1-*O*- β -glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3-hydroxy-3-méthylbutyl) benzène
Fig.20: L'acétophénone glycoside 12-*O*- β -glucopyranosyl-9 β , 12-dihydroxytremetone
Fig.21 : Apigénine-7-*O*- β -glucoside
Fig.22: Lutéoline-7-*O*- β -glucuronide
Fig.23: 7-méthyl aromadendrine
Fig.24: isoprénylhydroquinone glucoside
Fig.25: 3,5-dicafféoylquinique ester méthylique
Fig.26: *C. villosa* subsp. *intermedia*
Fig.27: *I. planifolia*
Fig.28: *A. halimus*
Fig.29: Structure chimique de quelques composés extraits des huiles essentielles.
Fig.30: Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.
Fig.31: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH°) (violet)
Fig.32: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) (Jaune)
Fig.33: Diamètre d'inhibition sur disque.
Fig.34: Procédure du test de la sensibilité aux antimicrobiens par la méthode des disques (NCCLS).
Fig.35: Détermination de la CMI et de la CMB d'un antibiotique avec la méthode de dilution en milieu liquide.

Fig.36: Montage de l'hydrodistillation.

Fig.37: *A. halimus* séché puis finement broyé.

Fig.38: L'extrait aqueux brut séché de l'*A. halimus*.

Fig.39: Rat wistar

Fig.40: Structure de la streptozotocine.

Fig.41: Anesthésie par voie intrapéritonéale.

Fig.42: Injection de streptozotocine par voie intraveineuse.

Fig.43: Gavage

Fig.44: Prélèvement du sang dans le sinus rétro-orbitale.

Fig.45: Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. sordidum* L.

Fig.46: Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. saxatile*.

Fig.47: Chromatogrammes des fractions F1, F2, et F3 de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. sordidum* L.

Fig.48 : Chromatogrammes des fractions (F1, F2, et F3) de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. saxatile*.

Fig.49: Courbe d'étalonnage des phénols totaux.

Fig.50 : Évolution du poids des rats normaux et diabétiques témoins et traités durant les quatre semaines de traitement.

Fig.51: Évolution de la glycémie des rats normaux et diabétiques témoins et traités durant les quatre semaines de traitement.

Fig.52: Test de la tolérance orale des rats au glucose.

Fig.53: Effet de l'extrait sur la glycémie à jeun pendant trois heures.

Liste des Histogrammes

Histogramme 1: Composition chimique de l'huile collective de *P. sordidum* L.

Histogramme 2: Composition chimique de l'huile collective de *P. saxatile*

Histogramme 3: Variation de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. sordidum* L. en fonction du stade de développement de la plante.

Histogramme 4: Variation de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. saxatile* en fonction du stade de développement de la plante.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION GENERALE

1

CHAPITRE 1 : « RECHERCHE BIBLIOGRAPHIE »

Sommaire

4

4

I- ETUDE DES PHAGNALONS

5

I.1. Etude botanique

5

I.1.1. Introduction

5

I.1.2. Répartition géographique et espèces des *Phagnalons*

6

I.1.3. Description botanique du *P. sordidum* (L.) DC

6

I.1.4. Description botanique du *P. saxatile* (L.) Cass.

6

I.2. Etude chimique

7

I.2.1. *P. sordidum* (L.) DC

7

I.2.2. *P. saxatile* (L.) Cass.

10

I.2.3. *P. rupestre* L.

II- ETUDE DES CALYCOTOMES

12

II.1. Etude botanique

12

II.1.1. Introduction

12

II.1.2. Répartition géographique et espèces de *C.villosa* subsp. *intermedia*

12

II.1.3. Description botanique de *C.villosa* subsp. *intermedia*

12

II.2. Etude chimique

13

14

| | |
|--|----|
| III- ETUDE DES IRIS | |
| III.1. Etude botanique | 15 |
| | 15 |
| III.1.1. Introduction | 15 |
| III.1.2. Répartition géographique des <i>Iris</i> | 16 |
| III.1.3. Description botanique de l' <i>I.planifolia</i> (Mill.) | 17 |
| III.2. Etude chimique | 18 |
| | 18 |
| IV- ETUDE DES ATRILEX | 18 |
| IV.1. Etude botanique | 18 |
| IV.1.1. Introduction | 19 |
| IV.1.2. Répartition géographique de l' <i>A. halimus</i> | 19 |
| IV.1.3. Description botanique de l' <i>A. halimus</i> | 20 |
| VI.2. Etude chimique | |
| | |
| <u>CHAPITRE 2</u> :« ETUDES DES HUILES ESSENTIELLES » | 21 |
| <i>Sommaire</i> | |
| I- INTRODUCTION | 22 |
| II- CHIMIE DES HUILES ESSENTIELLES | 22 |
| II.1. Composition chimique | 22 |
| II.2. Variabilité phytochimique | 22 |
| III- EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES | 24 |
| IV- METHODES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES | 26 |
| IV.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) | 27 |
| IV.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse | 27 |
| (CPG/SM) | |
| IV.3. Acquisition et traitement des données | |

CHAPITRE 3 : « ETUDE DES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES PLANTES MEDICINALES »

| | |
|---|----|
| <i>Sommaire</i> | 31 |
| I- ACTIVITE ANTIOXYDANTE | 31 |
| I.1. Généralités | 32 |
| I.2. Systèmes antioxydants | 32 |
| I.3. Techniques d'évaluation de l'activité anti-oxydante | 33 |
| I.3.1. Test de réduction du radical stable, DPPH° | 34 |
| I.3.2. Test de réduction du Fer (FRAP) | 37 |
| I.3.3. Test ORAC | 38 |
| I.4. Les antioxydants polyphénoliques | 38 |
| II.4.1. Introduction | 38 |
| II.4.2. Actions pharmacologiques des polyphénols | 39 |
| II.4.3. Relation entre les antioxydants et les polyphénols | 40 |
| II- ACTIVITE ANTIMICROBIENNE | 41 |
| II.1. Généralités | 41 |
| II.2. Techniques d'évaluations de l'activité antimicrobienne | 42 |
| II.2.1. Méthode de diffusion sur disque | 42 |
| II.2.2. Méthode de dilution | 44 |
| II.2.2.1. Dilution en milieu liquide | 44 |
| | 45 |

| | |
|---|----|
| II.2.2.2. Dilution en milieu solide | 45 |
| II.3. Facteurs influant sur l'activité antimicrobienne | 45 |
| II.3.1. Contact de la bactérie avec l'antibiotique | |
| II.3.2. Etendue de l'inoculum | 46 |
| II.3.3. Composition et température du milieu | 46 |

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 4 : « MATERIELS ET METHODES »

| | |
|-----------------|----|
| <i>Sommaire</i> | 47 |
|-----------------|----|

I- CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES 47

I.1. Provenance du matériel végétal et identification 48

I.2. Extraction des huiles essentielles 48

I.2.1. Hydrodistillation 49

I.2.2. Principe de l'hydrodistillation 49

I.2.3. Technique 50

I.3. Caractérisation des huiles essentielles 50

I.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) 51

I.3.2. Couplage Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) 51

I.3.3. Chromatographie sur colonne de silice 52

II- ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES 53

II.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne 53

II.1.1. Technique de dilution (CMI) 53

| | |
|---|----|
| II.1.2. Détermination des CMI par la méthode de dilutions | 54 |
| II.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante | 54 |
| | 54 |
| II.2.1. Test de réduction du radical stable, le DPPH° | 54 |
| II.2.2. Méthode de la réduction du fer (FRAP) | 55 |
| III- ETUDE PHYTOCHIMIE ET ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'A. <i>halimus</i> | 56 |
| III.1 Matériel végétal | 56 |
| III.1.1. Préparation de l'extrait aqueux brut | 56 |
| III.1.2. Tests phytochimiques | 57 |
| III.1.3. Dosage des phénols totaux | 57 |
| III.1.3.1. Principe | 57 |
| III.1.3.2. Protocole | 57 |
| III.2. Matériel animal | 58 |
| III.2.1. Toxicité aigüe | 58 |
| III.2.2. Induction du diabète chez les rats | 58 |
| III.2.3. Lots expérimentaux | 59 |
| III.2.4. Gavage de l'extrait | 60 |
| III.2.5. Suivi des animaux | 60 |
| III.2.6. Prélèvement du sang | 60 |
| III.2.7. Suivi à court terme | 61 |
| III.2.8. Test de tolérance au glucose | 61 |
| | |
| <u>CHAPITRE 5</u> :« CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS DE CINQ PLANTES AROMATIQUES » | 62 |
| I-INTRODUCTION | 63 |

| | |
|---|----|
| II- HUILE ESSENTIELLE DE <i>Phagnalons</i> | 63 |
| II.1. Analyse des huiles essentielles des <i>Phagnalons</i> | 63 |
| II.2. Variabilité chimique | 73 |
| II.3. Composition chimique des H.E en fonction du cycle végétatif | 80 |
| | |
| III- HUILE ESSENTIELLE DE <i>C. villosa subsp. Intermedia</i> | 82 |
| III.1. Extraction des huiles essentielles | 82 |
| III.2. Caractérisation des huiles essentielles | 82 |
| | |
| IV- IV- HUILE ESSENTIELLE DE L'<i>I. planifolia</i> | |
| IV.1. Extraction des huiles essentielles | 84 |
| IV.2. Caractérisation des huiles essentielles | 84 |
| | 84 |
| | |
| V. HUILE ESSENTIELLE DE L'<i>A. halimus</i> | 86 |
| V.1. Extraction des huiles essentielles | 86 |
| V.2. Caractérisation des huiles essentielles | 86 |
| | |
| <u>CHAPITRE 6 : « EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES »</u> | 90 |
| | |
| <i>Sommaire</i> | 90 |
| I-INTRODUCTION | 91 |
| II-EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE | 91 |
| III -EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE | 94 |
| | |
| <u>CHAPITRE 7 : « ETUDES PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'<i>A. HALIMUS</i> »</u> | |
| | |
| <i>Sommaire</i> | 97 |
| I- INTRODUCTION | 98 |
| II- CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE | |

| | |
|--|-----|
| L'A. <i>halimus</i> | 98 |
| III-DOSAGE DES POLYPHENOLS | 100 |
| IV-ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'A. <i>halimus</i> | 100 |
| IV.1. Résultats | 100 |
| IV.1.1. Toxicité aigüe de l'extrait de l'A. <i>halimus</i> | 100 |
| IV.1.2. Induction du diabète par la Streptozotocine | 100 |
| IV.1.3. Evolution du poids des rats | 100 |
| IV.1.4. Evolution de la glycémie à jeun | 101 |
| IV.1.5. Test de tolérance orale au glucose | 101 |
| IV.1.6. Test à court terme | 102 |
| IV.2. Discussion | 103 |
| CONCLUSION GENERALE | 105 |
| BIBLIOGRAPHIE | 107 |
| LISTE DES TRAVAUX | 121 |

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. Les traitements par les plantes tiennent une place prépondérante et connaissent un nouvel engouement vu la part croissante d'utilisation des plantes médicinales. La phytothérapie apparaît dès lors comme providentielle, elle offre un axe de recherche et de développement stratégique.

L'industrie médicale mondiale utilisant les Plantes Aromatiques et Médicinales « PAM » a augmenté de façon exponentielle au cours de ces dernières décennies et connaissent un succès accru suite à la révolution « bio », « environnement sain » et « développement durable ». Le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement 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 « HE » et métabolites secondaires, présentent un potentiel important en tant qu'agents antibactériens, antifongiques, antioxydants, antidiabétiques etc.

La conception et la réalisation de notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de ressources végétales par des recherches scientifiques afin de déterminer les molécules porteuses de l'effet thérapeutique des plantes médicinales sélectionnées et aussi pour bien percer le mystère des plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales et exploiter cette richesse naturelle. Le choix des plantes étudiées repose simplement sur une tradition ancestrale d'utilisation et il n'y a que peu de recherche scientifique permettant d'expliquer le mode d'action des produits extraits. En effet, la mise en place des outils d'analyse aiguisés permet d'obtenir un totum de qualité. Ce dernier doit être analysé avec des techniques modernes car sa composition chimique peut varier, en fonction de la biologie de la plante, de son écologie, de sa période de récolte et du mode d'extraction employé. Les variations de la composition chimique ont une influence sur son activité pharmacologique et donc sur sa qualité.

Dans cette thèse, on propose d'étudier des Plantes Médicinales et Aromatiques (PAM), qui poussent à l'état spontané dans l'ouest d'Algérie. L'étude phytochimique a été conduite sur les plantes récoltées dans les différents sites naturels de l'ouest d'Algérie. Plusieurs fouilles effectuées dans différents endroits, ont permis le recensement et la caractérisation botanique de

cinq espèces qui n'ont pas, ou très peu, été étudiées jusqu'à présent. L'étude et le choix des PAM a été dans un but fixé, aucune ne prévaut sur les autres, tout est dans une optique d'investigation sur un grand nombre d'espèces médicinales peu étudiées afin d'augmenter nos chances d'isoler de nouveaux produits naturels et d'étudier les propriétés pharmacologiques d'un panel des PAM. L'intérêt de ces travaux est multiple, c'est un travail qui se situe au carrefour de la chimie et de la biologie. En ayant une connaissance sur les propriétés chimiques et biologiques des produits naturels à l'échelle moléculaire, on pourra être en mesure de mieux exploiter les ressources naturelles et de créer des stratégies innovantes pour une gestion durable de la flore algérienne.

En première partie, on s'est intéressé à étudier la composition chimique des huiles essentielles. La deuxième partie est réservée à l'évaluation des propriétés pharmacologiques des huiles essentielles, et des extraits bruts : aptitudes à inhiber la croissance bactérienne, tendance à piéger le radical libre du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl et à réduire le fer. Au cours d'une troisième partie, on a étudié l'activité antidiabétique des extraits aqueux d'une plante reconnue traditionnellement pour une utilisation répandue chez les diabétiques. La détermination des propriétés chimique et biologique des totums permet de les caractériser et de mettre en évidence une éventuelle application en pharmacie, en cosmétique etc.

Notre démarche s'est inspirée essentiellement de la richesse naturelle de la flore algérienne. Pour cela, on a sélectionné cinq PAM : *Phagnalon sordidum*, *Phagnalon saxatile*, *Calycotome villosa subsp. intermedia*, *Iris planifolia* et *Atriplex halimus*.

Le manuscrit comporte deux parties principales. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres :

- ✚ Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique des espèces sélectionnées. Cette section est composée de cinq parties comportant chacune des études botanique et chimique détaillée sur l'une des plantes étudiées.
- ✚ Le deuxième chapitre a trait aux méthodes d'analyses chromatographiques. Notamment, on a illustré la méthodologie d'analyse pour caractériser la composition chimique des huiles essentielles.
- ✚ Le troisième chapitre résume succinctement la biologie des produits naturels issus de la biomasse. Cette partie résume la méthodologie suivie lors de l'évaluation des propriétés pharmacologiques d'un principe actif extrait de plante.

Dans la deuxième partie de ce travail, on a présenté en détail des résultats obtenus. La première section de cette partie rapporte les protocoles expérimentaux et les techniques de caractérisations, mis en œuvre pour déterminer la composition chimique des huiles essentielles ainsi que les méthodes utilisées pour évaluer les activités biologiques. La composition chimique des huiles essentielles des espèces sélectionnées est décrites, ensuite, succinctement. Cette section est scindée en quatre parties, chacune rapporte l'analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles étudiées. Ensuite, les activités antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles sont abordées.

Enfin de la deuxième partie, on a présenté les travaux phytochimiques réalisés sur les extraits aqueux à savoir les résultats de criblage phytochimique et de dosage des polyphénols. Une évaluation de l'activité antidiabétique des extraits aqueux est ensuite réalisée. A suivre enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (**LASNABIO**) - Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou-Bekr-Belkaïd, Tlemcen. Il s'inscrit dans le cadre d'un projet de développement de la filière PAM en Algérie. Ma préparation de thèse s'inscrit également dans une dynamique d'échange et de collaboration internationale « Projet TASSILLI ». Dans ce contexte, le Laboratoire de Chimie de Produits Naturels (**CPN**) - Université de Corse (France) a collaboré à ces recherches. Au niveau national, on a collaboré avec le Laboratoire Antibiotique, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (**LAPSAB**) - Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou-Bekr-Belkaïd, Tlemcen.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIE

Chapitre I :

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIE

Sommaire

I- ETUDE DES PHAGNALONS

I.1. Etude botanique

I.1.1. Introduction

I.1.2. Répartition géographique et espèces de *Phagnalons*

I.1.3. Description botanique du *P. sordidum* (L.) DC

I.1.4. Description botanique du *P. saxatile* (L.) Cass.

I.2. Etude chimique

I.2.1. *P. sordidum* (L.) DC

I.2.2. *P. saxatile* (L.) Cass.

I.2.3. *P. rupestre* L.

II- ETUDE DES CALYCOTOMES

II.1. Etude botanique

II.1.1. Introduction

II.1.2. Répartition géographique et espèces de *C. villosa* subsp. *intermedia*

II.1.3. Description botanique de *C. villosa* subsp. *intermedia*

II.2. Etude chimique

III- ETUDE DES IRIS

III.1. Etude botanique

III.1.1. Introduction

III.1.2. Répartition géographique des *Iris*

III.1.3. Description botanique de l'*I. planifolia* (Mill.)

III.2. Etude chimique

IV- ETUDE DES ATRIPLEX

IV.1. Etude botanique

IV.1.1. Introduction

IV.1.2. Répartition géographique de l'*A. halimus*

IV.1.3. Description botanique de l'*A. halimus*

VI.2. Etude chimique

I- ETUDE DES PHAGNALONS

I.1. Étude botanique :

I.1.1. Introduction :

Le nom du genre *Phagnalon*, est dû à **Cassini Gabriel (1819)**. C'est une anagramme de *gnaphalon* (ou *gnaphallon*), terme qui désignait en grec la bourre floconneuse des matelas et qui est à l'origine du genre *Gnaphalium*. Les *Phagnalons* sont connus localement par les noms « Foddia » ou « Arfedj » (**Borullard 1997; Quèzel et Santa, 1963**).

Les *Phagnalons* appartiennent à la famille des Astéracées. C'est une importante famille de plantes dicotylédones qui regroupent 20000 espèces (**Tardif et Coll., 2003**). Ce sont essentiellement des plantes herbacées, des arbustes, quelques fois petits arbres (artichaut, camomille, cardon, chicorée, estragon, laitue, etc.) (**Normard et Coll., 1976**). Elle comprend des espèces utilisées soit pour l'alimentation soit comme plantes ornementales, aromatiques ou médicinales (**Hullé et Coll., 1999**).

Les *Phagnalons* sont largement utilisés en médecine traditionnelle. En Islande, *Phagnalon sordidum* est utilisé seul ou mélangé avec *Lippi acitriodora* et/ou *Malva sylvestris* pour guérir la lithiase rénale (**Epifano et Coll., 2002**). D'autre part, les bédouins du désert du Néguev, utilisent l'écorce de *Phagnalon rupestre*, pour la guérison des brûlures. Néanmoins, en médecine populaire, les palestiniens utilisent la plante entière pour traiter l'asthme, maux de tête, et comme un analgésique pour les maux de dents (**Ali-Shtayeh et Coll., 1998**).

Le genre *Phagnalon* (Astéracées) est représenté par environ 40 espèces réparties de la Macaronésie à l'Himalaya et à l'Éthiopie. Il est rangé dans la tribu des *Gnaphalieae*. Les plantes de ce genre ont deux sortes de fleurs dans chaque capitule : celles du milieu sont en tube, à 5 dents ; celles du pourtour sont en languette très étroite. Ce sont des plantes vivaces, couvertes de poils plus ou moins cotonneux, ligneuses dans leur partie inférieure, à fleurs jaunes ou jaunâtres (**Qaiser, 1985; Qaiser, 1986**).

I.1.2. Répartition géographique et espèces de *Phagnalons* :

Le genre *Phagnalons* comprend vingt espèces originaires de la région méditerranéenne ou de l'Asie centrale. En Algérie il existe quatre phagnalons principaux (*P. sordidum* (L.) DC., *P. garamantum* M., *P. saxatile* (L.) Cass., *P. rupestre* (L.) DC.), ainsi que de nombreuses espèces hybrides ont été signalés (**Salgues, 1963; Quèzel et Santa, 1963**).

On le trouve dans les rochers, murs de la région méditerranéenne des Alpes-Maritimes aux Pyrénées centrales, Drome, l'Ardèche et l'Aveyron, Corse, Espagne, Italie (Salgues, 1963).

I.1.3. Description botanique du *P. sordidum* (L.) DC :

Les *P. sordidum* sont des herbes vivaces répandues dans toute la région méditerranéenne. Ils sont blanchâtres, et leurs odeurs sont désagréables. Les feuilles, très étroites, sont enroulées sur les bords. Les capitules sont groupés par deux à six à l'extrémité des rameaux. Les bractées sont bien appliquées contre le capitule.

- ❖ Hauteur : 15 à 40 cm.
- ❖ Capitule: 8 à 10 mm.
- ❖ Floraison: mai à juillet.

Tableau 1 : Description de *P. sordidum* L. (Quèzel et Santa, 1963).

| Partie de la plante | Description |
|----------------------|--|
| Rameau | Jeunes rameaux anguleux et glanduleux-hispides. |
| Feuilles inférieures | obovales-lancéolées, atténuées en pétiole et semi-amplexicaules. |
| Feuilles supérieures | linéaires, à marge révolutée, semi-amplexicaules. |
| Capitules | de 1-1,3 cm de diamètre |
| Réceptacle | glabre à bractées larges, toutes à marge scarieuse. |
| Fleurs | Jaunes à sommet pourpre. |
| Akènes | Akènes à aigrette constituée par 4-5 soies fragiles et très longues. |



Fig.1 : *P. sordidum* L.

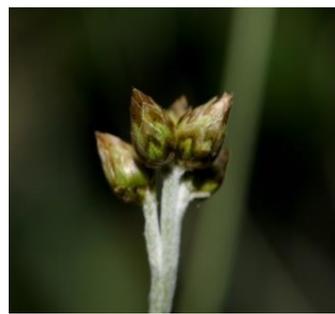


Fig.2 : *P. sordidum* L. (fleurs).

I.1.4. Description botanique du *P. saxatile* (L.) Cass. :

C'est une plante méditerranéenne, assez commune, qui croît sur les murs et les rochers, mais aussi dans les pelouses rocailleuses. Les feuilles, très étroites, sont vertes sur la face supérieure et

cotonneuse en dessous. Les capitules sont solitaires à l'extrémité des rameaux. Les bractées externes sont recourbées vers l'extérieur.

- ❖ Hauteur : 20 à 60 cm.
- ❖ Capitule : 8 à 10 mm.
- ❖ Floraison : mars à octobre.

❖ **Tableau 2** : Description de *P. saxatile* (L.) Cass. (Quèzel et Santa, 1963).

| Partie de la plante | Description |
|----------------------|---|
| Feuilles inférieures | Linéaires-lancéolées, blanches-tomenteuses |
| Feuilles supérieures | Etroitement linéaires, vertes ou blanchâtres. |
| Capitules | Toujours solitaires |
| Bractées | Glabres, scarieuses, |
| Fleurs | Jaunes. |
| Tiges | Dressées, très rameuses |

I.2. Etude chimique :

Les *Phagnalons* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques; on reprend, à la suite, les principaux travaux réalisés sur les extraits et les huiles essentielles obtenues à partir des principales espèces de *Phagnalons*.

I.2.1. *P. sordidum* (L.) DC :

P. sordidum est une espèce très peu étudiée chimiquement. D'après les données bibliographiques, seul deux études ont été signalées :

- ❖ **Hausen et Coll. (1977)** ont pu isoler, à partir des fruits, des feuilles et des tiges, le premier métabolite de cette espèce, le 2-diméthylallyl-*p*-benzoquinone avec un rendement de 0,02%. Il est à noter que cette étude révèle l'existence du 2-diméthylallyl-*p*-benzoquinone dans les trois espèces de phagnalons (*P. sordidum*, *P. saxatile*, *P. rupestre*).
- ❖ **Epifano et Coll. (2002)** ont montré que l'analyse des métabolites secondaires, extraits à partir de la partie aérienne d'un spécimen du *P. sordidum* collecté en Italie, a conduit à l'isolement de plusieurs composés chimiques. La purification de l'extrait méthanolique et hexanique a permis l'identification de cinq composés. Il s'agit de: β -D - glucopyranoside, lupane, β -sitostérol, L-(-)-chiroinositol et l'acide bétulinique.

Ce dernier est connu pour ses activités thérapeutiques. En outre, ce composé possède une activité anticancéreuse et antivirale. L'acide bétulinique s'est avéré cytotoxique contre de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. De plus, il présente une faible toxicité pour les cellules saines de l'organisme ce qui en fait un traitement potentiel pour certaines tumeurs cancéreuses.

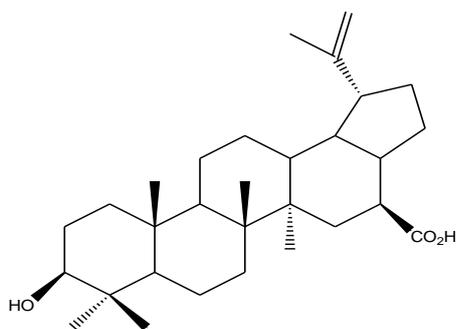


Fig.3 : Acide bétulinique

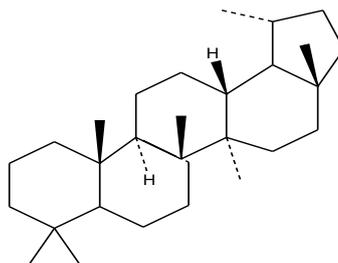


Fig.4 : Lupane

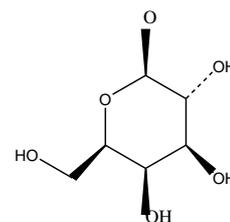


Fig.5 : β -D-Glucopyranoside

À l'heure actuelle, aucune étude sur la caractérisation chimique de l'huile essentielle de cette plante ni de son activité biologique n'a été publiée. Ceci nous a amené à nous intéresser de près au *P. sordidum* L. afin de détecter d'éventuel nouveau produit.

1.2.2. *P. saxatile* :

L'espèce de *P. saxatile* a fait l'objet de plusieurs travaux. En Italie, pour la première fois une étude a décrit l'activité *in vitro* de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *P. saxatile* L. (Astéracées) dans le traitement de l'inflammation liée à la maladie d'Alzheimer (**Conforti et Rigano, 2010**).

Récemment **Conforti et Rigano (2010)** ont consacré une étude sur le potentiel phytochimique et pharmacologie du *P. saxatile*. L'étude effectuée sur le pouvoir anti-inflammatoire de la partie aérienne du *P. saxatile* L. provenant d'Italie, révèle :

- ✓ La présence de l'acide caféique et de l'acide méthyle chlorogénique inhibent respectivement, la production de NO avec des valeurs IC₅₀ de 7µg/ml et 12µg/ml.

De plus, d'autres produits ont été isolés et leur activité anticholinestérase a été mise en évidence :

- ✓ La lutéoline et l'acide 3,5-dicafféoylquinique exposent l'activité la plus prometteuse contre l'acétylcholinestérase avec une IC_{50} de $25,2\mu\text{g/ml}$ et $54,5\mu\text{g/ml}$, respectivement (Conforti et Rigano, 2010).

D'autre part, l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique a été évaluée par la méthode de DPPH et le test de β -carotène. Les résultats révèlent un pouvoir antioxydant très fort, de l'ordre de (IC_{50} $25\mu\text{g/ml}$), (IC_{50} $14\mu\text{g/ml}$) respectivement pour le DPPH et la β -carotène. Des études antérieures sur l'extrait méthanolique des parties aériennes de *P. saxatile* (L.) Cass., ont conduit à l'isolement de plusieurs composés dont quelques-uns sont représentés ci-dessous (Conforti et Rigano, 2010) :

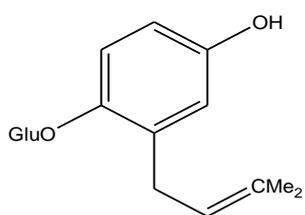


Fig.6 : 1-*O*- β glucopyranosyl-2-(3,3-diméthylallyl)hydroquinone

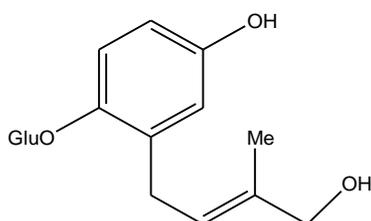


Fig.7: 1-*O*- β glucopyranosyl-2-(3-hydroxyméthyl-3-méthyl allyl)hydroquinone

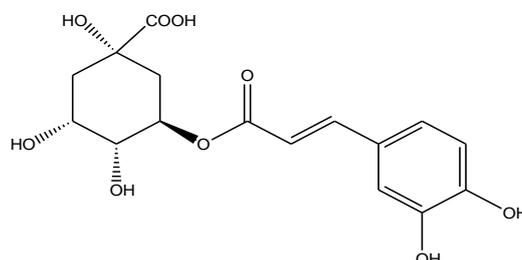


Fig.8 : Acide chlorogénique

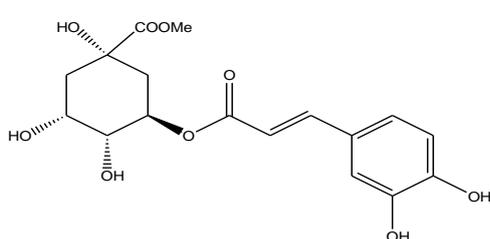


Fig.9 : Acide méthylchlorogénique

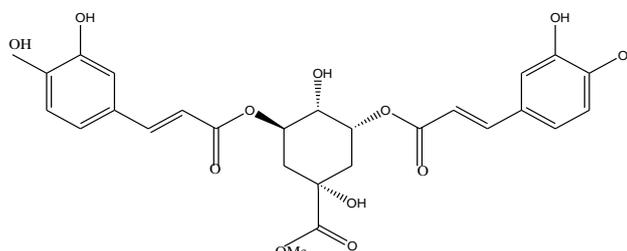


Fig.10 : 3,5-di-*O*-cafféoylquinique méthyle ester

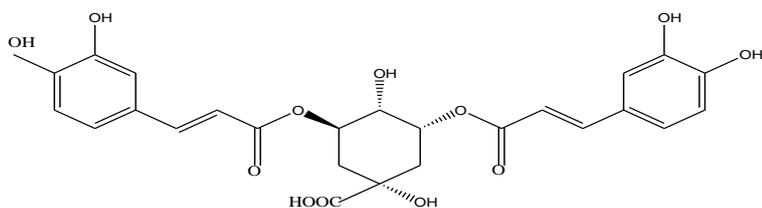


Fig.11: 3,5-di-*O*-acide cafféoylquinique

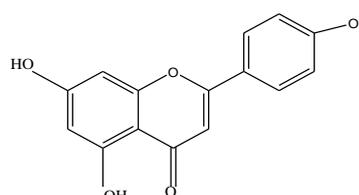
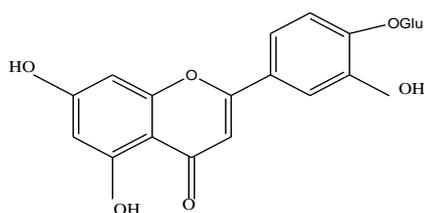


Fig.12 : Apigénine



ig.13 : Lutéoline-4-glucopyranoside

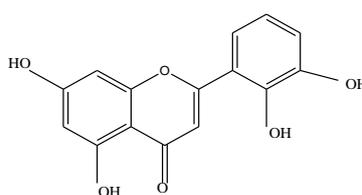


Fig.14 : Lutéonile

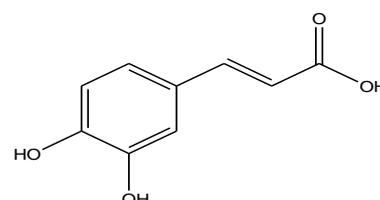


Fig.15 : Acide caféique

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude du profil chimique de l'huile essentielle de *P. saxatile*. Seule une étude a traité la composition de l'huile essentielle du *P. saxatile* (L.) Cass., d'origine italienne. Soixante six composés ont été identifiés représentant 93,2% de composition totale de l'huile essentielle. Cette dernière est principalement caractérisée par la prédominance : des sesquiterpènes (23,9%), vient ensuite les acides gras (21,8%) et les cires (19,3%) et enfin les monoterpènes (14,6%) (Senatore et Coll., 2005).

Les composés majoritaires sont :

- Les monoterpènes hydrocarbonés : β -pinène (5,4%), limonène (3,5), *p*-cymène (2,1%).
- Les monoterpènes oxygénés : 4-terpinéol (0,3%), linalol (0,2%).
- Les sesquiterpènes hydrocarbonés : caryophyllène (4,6%), γ -cadinène (3,0%) et aromadendène (2,2%).
- Les sesquiterpènes oxygénés : spathuléol (1,8%).
- Finalement, les acides sont représentés principalement par l'acide hexadécanoïque (17,4%).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été testée sur des souches à Gram-(+) et Gram(-), néanmoins, aucune inhibition des souches n'a été signalée.

1.2.3. *P. rupestre* L. :

Plusieurs études ont été menées sur *P. rupestre*, permettant l'isolement d'un grand nombre de composés de qualité appréciable. Leurs propriétés pharmacologiques ont été également étudiées.



Fig.16 : *P. rupestre* L.

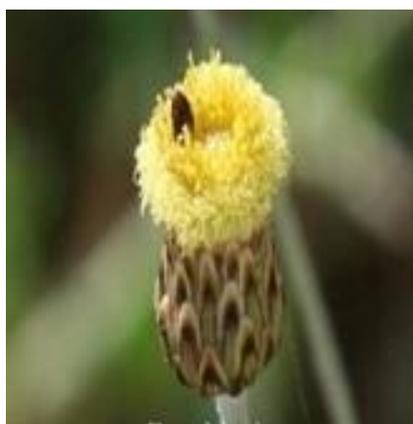


Fig.17 : *P. rupestre* L. (fleurs)

L'analyse de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *P. rupestre* (Astéracées) a conduit à l'isolement de composés phénoliques dont trois ont été identifiés sur base de leurs spectres RMN comme nouveaux composés naturels (Gongora et Coll., 2002).

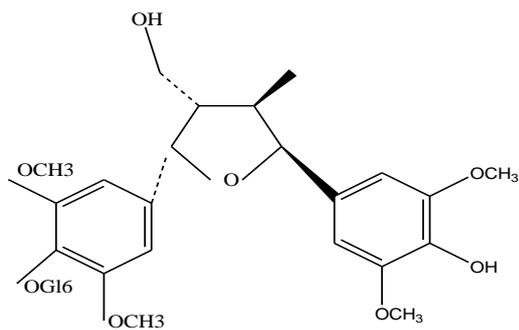


Fig.18: 7,7-bis-(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)-8,8-dihydroxyméthyl-tétrahydrofurane-4-O-β-glucopyranoside

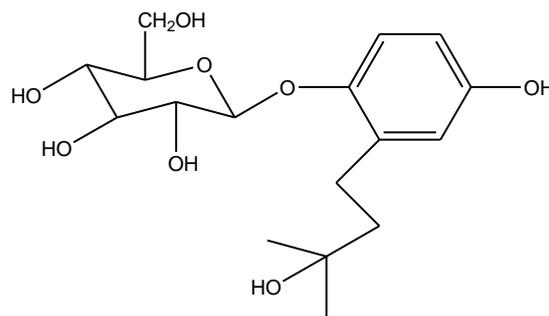


Fig.19 : Prénylhydroquinone glycoside 1-O-β-glucopyranosyl-1,4-dihydroxy-2-(3-hydroxy-3-méthylbutyl) benzène

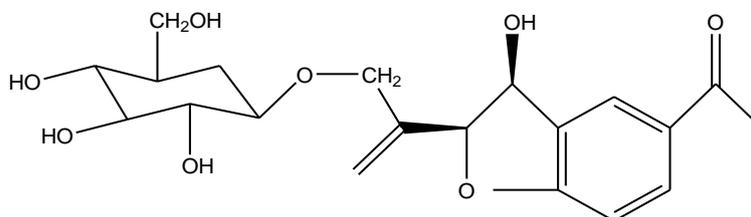


Fig.20 : L'acétophénone glycoside 12-O-β-glucopyranosyl-9β, 12-dihydroxytremetone

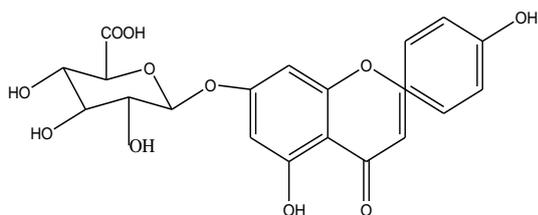


Fig.21 : Apigénine-7-O-β-glucoside

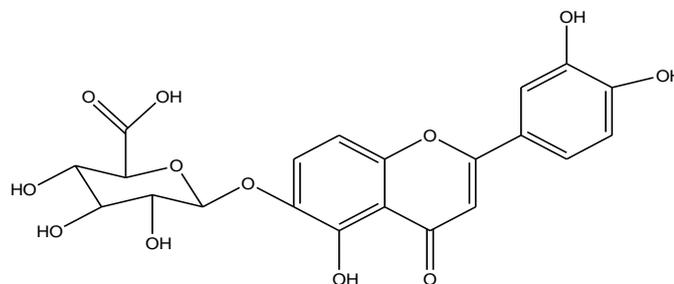


Fig.22: Lutéoline-7-O-β-glucuronide

L'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique a été testée contre sept souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) et une levure (*Candida albicans*). L'extrait montre une activité de 77,86% contre *Staphylococcus aureus* et de 71,71% contre *Bacillus cereus*. Néanmoins, l'extrait éthanolique inhibe faiblement les autres souches (Ali-Shtayeh et Coll., 1998).

Le *P. rupestre* de l'ouest méditerranéen a été étudié pour son activité inhibitrice contre la carbonylation des protéines. Les composés responsables de cette activité sont représentés sur les figures 23, 24 et 25 (Marin et Coll., 2011) :

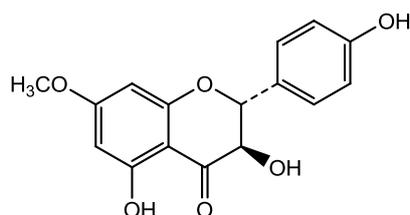


Fig.23: 7-méthyl aromadendrine

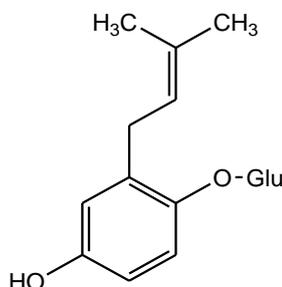


Fig.24: isoprénylhydroquinone glucoside

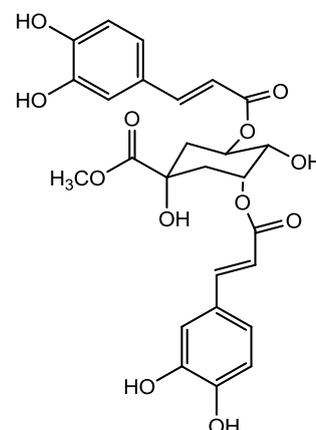


Fig.25: 3,5-dicafféoylquinique ester méthylique

II- ETUDE DES CALYCOTOMES

II.1. Étude botanique :

II.1.1. Introduction :

Le genre *Calycotome* appartient à la famille des Fabacées. Ces dernières constituent la troisième famille la plus importante du règne végétal (environ 16000 espèces) après les Astéracées et les Orchidacées. Les *Calycotomes* sont des arbrisseaux épineux, genêt à tiges élancées et écartées, formant des buissons qui peuvent atteindre 2 mètres de hauteur. Leurs rameaux sont verts, puis bruns en vieillissant, et se terminent en épines (Quèzel et Santa, 1963; Talavera et coll., 1999; García Murillo, 1999).

II.1.2. Répartition géographique de *C. villosa* subsp. *intermedia* :

Le *Calycotome* préfère les sols siliceux. En région méditerranéenne, les *Calycotomes* sont représentés principalement par trois espèces (*C. spinosa*, *C. villosa*, *C. villosa* subsp. *intermedia*). Lorsqu'on le rencontre dans la garrigue, c'est le signe d'une certaine pauvreté en calcaire. On le trouve dans les forêts de pin maritime, dans les subéraies et le maquis qu'il contribue à rendre difficilement pénétrable.

Les genêts sont capables grâce aux nodosités sur leur racines, de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés. Les ruminants évitent cette plante à cause de ses épines.

Le *C. villosa* subsp. *intermedia* vit dans les montagnes proches du littoral en Afrique du Nord et en Espagne méridionale (Quèzel et Santa, 1963; Domínguez, 1987).

II.1.3. Description botanique de *C. villosa* subsp. *intermedia* :

Les *Calycotomes* se sont des arbrisseaux épineux, genêt à tiges élancées et écartées, formant des buissons qui peuvent atteindre deux mètres de hauteur. Son rameau est vert, puis brun en vieillissant, et se termine en épine. Les feuilles sont composées de trois folioles ovales. Elles sont petites peu nombreuses et caduques. Les fleurs apparaissent dès la fin de l'hiver. Elles sont jaunes, groupées et très nombreuses. Les fruits sont des gousses aplaties, longues de trois à quatre cm, contenant trois à huit graines

C. villosa subsp. *intermedia* est très répandu dans l'ouest d'Algérie. Elle s'appelle localement « Guendoul ». Cet arbuste se distingue par ses gousses soyeuses mais non ailées sur la suture ventrale qui est simplement épaissie. Cette espèce est considérée comme une sous-espèce de *C. villosa*. C'est un arbuste de 1 - 1,5 mètre de hauteur, très ramifié, à nombreux rameaux courts se terminant en fortes épines. Les tiges sont parcourues par 13-16 fines côtes longitudinales. Les feuilles, assez longuement pétiolées, comportent trois folioles ovales obtuses. Enfin, la période de stade de floraison s'étale entre mars et juin.

- ❖ Hauteur : 1 à 1,5 m.
- ❖ Floraison: mars et juin

❖ **Tableau 3:** Description de *C. villosa* subsp. *intermedia* (Quèzel et Santa, 1963).

| Partie de la plante | Description |
|---------------------|--|
| Feuilles | Fleurs en faisceaux, au nombre de 8-15 |
| Rameaux | Gris courts se terminant en fortes épines, couverts d'un duvet pulvérulent |
| Feuilles | Assez longuement pétiolées, comportent 3 folioles obovales |
| Fleurs | Jaunes. |
| Tiges | parcourues par 13-16 fines côtes longitudinales |
| Gousse | Aplatie villeuse, à ailes de la suture ventrale très courtes |



Fig.26 : *C. villosa* subsp. *intermedia*

II.2. Étude chimique :

Les *calycotomes* sont des espèces riches en métabolites secondaire. Ils ont fait l'objet de plusieurs travaux. On cite dans ce paragraphe les travaux phytochimiques qui leurs ont été consacrés.

El Antri et Coll. (2010) ont contribué à l'étude des graines de *C. villosa* subsp. *intermedia*. Leurs travaux ont porté sur l'identification deux flavonoïdes. Il s'agit de 3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone et 3,5,7,4'-tétrahydroxy-8-méthoxyflavone. Dans cette étude, l'activité vasodilatatrice des flavonoïdes isolés a été démontrée. Sur le même organe de l'espèce, une étude a été consacrée aux alcaloïdes. Deux tétrahydroisoquinoline ont été isolés (**El Antri et Coll., 2010**).

De nombreux travaux ont permis de dévoiler la présence de composés flavonoïdes, alcaloïdes, anthraquinones (**Dessi et Coll., 2001; El Antri et Coll., 2004**). Cependant, très peu de recherches ont été menées sur l'huile essentielle de la partie aérienne de *C. villosa*. La composition chimique de l'huile rapportée par **Loy et Coll. (2001)** a été étudiée partiellement. Les auteurs ont identifié 21 composés représentant 26% de la composition totale de l'huile essentielle. Cette dernière est caractérisée principalement par eicosane (1,5%), heneicosane (2,8%), pentacosane (2,6%), tétracosane (2,6%), tricosane (1,9%), eugénol (1,8%), isoéugénol (1,8%), fenchone (1,8%). L'activité cytotoxique de l'huile a également été évaluée par **Loy et Coll. (2001)**. Les auteurs ont montré que l'huile est dotée d'une forte activité cytotoxique estimée à 0,04 µl/ml, principalement en raison de la présence de falcarinol, qui possède des effets négatifs et toxiques à des concentrations relativement élevées (**Hensen et Coll., 1986**).

D'autres travaux ont porté sur les propriétés pharmacologiques, notamment les activités hypotensive, diurétique et vasodilatatrice d'un glucoside chryisine isolé à partir des fleurs et des feuilles de *C. villosa* subsp. *intermedia*. Les résultats démontrent un effet diurétique ainsi qu'une action hypotensive du glucoside chryisine sur les rats anesthésiés. Les tests montrent un effet sur la fonction rénale (**Cherkaoui-Tangi et Coll., 2008**).

Il est à noter que l'équipe **Dessi et Coll. (2001)** ont travaillé sur quelques espèces poussant à l'état spontané dans la région Sardaigne en Italie. L'étude a porté sur les pouvoirs antioxydant et antimicrobien de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle. Elle rapporte que ces derniers inhibent la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus lentus* et *Cryptococcus neoformans*, à une concentration de l'ordre de 500 µg/ml. De plus, l'activité cytotoxique a été également déterminée. Les résultats révèlent que l'extrait méthanolique et l'huile essentielle de *C. villosa* subsp. *intermedia* étaient non toxiques (dose maximale non toxique, MNTD50 >500µg/ml). Enfin, il est à signaler que cette étude montre aussi que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante modérée.

III- ETUDE DES IRIS

III.1. Étude botanique :

III.1.1. Introduction :

L'*Iris* est une plante vivace à rhizomes ou à bulbes de la famille des Iridacées. Le mot « *iris* » est un emprunt médiéval au latin *iris*, *iridis*, lui-même emprunté au grec *Iris*, *Iridos* désignant la messagère des dieux, personnification de l'arc-en-ciel. Le terme a d'ailleurs longtemps été employé pour désigner l'arc-en-ciel. On le trouve associé à la fleur à partir du XIIIe siècle, en raison de la coloration de ses pétales, aux reflets irisés (**Lamendin, 2007; Coupla, 2012**).

Le genre *Iris* comprend environ 300 espèces dont 30 sont européennes. Leur répartition est mondiale et leurs milieux sont extrêmement diversifiés. Cette diversité est sans doute la conséquence de mécanismes de pollinisation favorisant le brassage génétique (**Belouahem et Coll., 2009**).

Certaines espèces sont très recherchées en parfumerie pour leurs rhizomes, des tiges souterraines et rampantes à partir desquelles on extrait l'essence d'iris et son principal composant, l'irone. Les espèces d'iris connaissent un grand succès dans l'horticulture et dans l'industrie cosmétique. Il s'agit principalement de l'*I. germanica*, plus connue sous le nom d'iris de Florence et l'*I. pallida*,

cultivé en Italie et au Maroc. Les espèces d'iris possèdent plusieurs vertus médicinales parmi lesquels on cite les effets béchique, émollient et expectorant. De plus, la littérature signale que les rhizomes d'iris ont des actions rubéfiante, vésicante, émétique et purgative. Ils sont toxiques à dose moyenne. Ces plantes refferment une substance âcre et un glucoside, l'irisine (**Garnero et Coll., 1978; Bernard, 2001; Couplan, 2009**).

III.1.2. Répartition géographique des *Iris* :

L'*iris* est une plante robuste à feuilles étroites en forme de sabre. Cette fleur, sauvage ou cultivée pour ses fleurs ornementales, fleurit au printemps et en été. Issue des régions tropicales et tempérées, on la trouve dans tout l'hémisphère nord, en Europe, en Asie, en Afrique du Nord et en Amérique du Nord. En Algérie ce genre est représenté principalement par trois espèces. Il s'agit de l'*I. pseudo acorus*, *I. unguicularis* et *I. planifolia* (**Belouahem et Coll., 2009**).

L'*I. planifolia* (Mill), connu localement par le non vernaculaire de « Kessar el touadjine », « nouar si Messaoud », « bouChahla », est largement distribué en Algérie, Crète, Grèce, Italie, Libye, Maroc, Portugal, Sardaigne, Sicile et en Espagne (**Quèzel et Santa, 1963**).

III.1.3. Description botanique de l'*I. planifolia* (Mill) :

Les *iris* sont des plantes rhizomateuses ou bulbeuses à feuilles linéaires. Les fleurs, généralement, disposées à 1-plusieurs dans une spathe. Périanthe à divisions onguiculées au-dessus du milieu, à limbe des 3 externes étalés ou réfléchis et limbe des 3 internes plus étroits, dressés ou peu étalés au sommet. Les étamines insérées sur la base des divisions externes, basifixes, recouvertes par les stigmates. La capsule a 3 côtés ou triquètre à angles saillants.

L'*I. planifolia* est une plante bulbeuse, à grosses racines naviformes, à bulbe de 1,5-8 cm de diamètre et à tuniques brunes. Les feuilles sont linéaires, linéaires-lancéolées ou ovaies-lancéolées. Les divisions du périanthe à limbe sont d'un beau bleu ou bleu violacé; les externes souvent pourvues au milieu de 2 petits lobes arrondis et portant une bande longitudinale jaune et papilleuse. L'*iris* a une tige très courte. La capsule est oblongue-sub-trigone, brusquement contractée en un bec très court (1-2 mm). Les graines sont brun rouge.

- ❖ Hauteur: 20 cm
- ❖ Bulbe : 1,5 à 8 cm
- ❖ Floraison : Janvier à Mars

❖ **Tableau 4** : Description de *I. planifolia* (Mill) (Quèzel et Santa, 1963).

| Partie de la plante | Description |
|---------------------|--|
| Feuilles | longues et effilées, parfois courbé. |
| Fleurs | divisé en trois parties égales chacune comporte une crête jaune vif sur les pétales vers la basse courbe |
| Graines | Brun-noir |
| Rhizome | rampant. |



Fig. 27 : *I. planifolia*

III.2. Étude chimique :

L'*Iris* est largement utilisé en médecines populaire. Dès le XVIIe siècle, on l'utilisait en médecine populaire. Le rhizome de l'*Iris* contient de l'irone en quantité appréciable. Cette substance lui confère son parfum agréable. L'*Iris* a divers effets thérapeutiques, notamment, antitussifs, diurétiques et purgatifs. Il est recommandé traditionnellement aux enfants qui font leur poussée dentaire pour qu'elle ne soit pas douloureuse. L'*Iris* est riche en métabolites secondaire. D'ailleurs, il est très apprécié dans les préparations cosmétiques car il préserve l'élasticité des peaux sèches, régule la séborrhée des épidermes et cuirs chevelus gras, et calme les peaux sensibles. Ses principes actifs forment un film protecteur qui galbe la peau et lui redonne de l'éclat (**Deshuparabhu, 1959; Hawana et Coll., 1991; Miyatke et Yashida 1997 ; Ali-Shtayeh et Coll., 2000**).

Les investigations phytochimiques effectuées sur les *Iris* font l'objet de nombreuses publications. Plus de 230 composés ont été isolés comprenant les flavonoïdes, les isoflavones, les stilbènes et leurs glycosides correspondants, les benzoquinones et les triterpénoïdes (**Miyatke et Yashida, 1997 Singh et Coll., 2006; Fang et Coll., 2007; Schütz et Coll., 2011**).

Les *Iris* sont réputés par leurs rhizomes qui sont la source des irones. Ces dernières sont très demandées dans l'industrie des odeurs. Il s'agit principalement de quatre isomères très

appréciables, trans- α , cis- α , cis- γ et β -irones. Il est à noter que ces derniers constituent la raison principale de l'intérêt considérable que suscite le secteur de cosmétique aux différentes espèces d'*Iris*. On note aussi que le type d'isomère présent décide de la qualité de l'huile. En effet, l'*Iris pallida* est très recherché par les aromaticiens car il est riche en énantiomère (-)-cis- γ -irone, contrairement à l'*iris germanica* contenant une quantité élevée en (+)-cis- α -irone (**Maurer et Coll., 1989; Bicchi et Rubiolo, 1993; Brenna et Coll., 2004; Roger et Coll., 2010**).

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés cytotoxiques qui peuvent être utilisés en chimiothérapie, **Fang et Coll. (2008)** ont examiné l'extrait du rhizome de l'*Iris tectorum*. L'étude a conduit à l'isolement de deux flavonoïdes, 7-O-méthyl aromadendrine, tectorigénine, et quatre triterpènes de type iridal, iritectols A et B, l'isoiridogermanale tiridobelamal A. Ces derniers ont montré une bonne activité cytotoxique en inhibant le cycle cellulaire des cellules cancéreuses. Ces résultats sont en accord avec l'utilisation traditionnelle de l'*Iris tectorum* dans le traitement du cancer. De plus, l'évaluation des activités biologiques des *iris*, a fait l'objet de plusieurs études publiées et de nombreuses activités ont été signalées à savoir, des propriétés antimicrobienne, antioxydante, antituberculeuse, anti-inflammatoire (**Rahman et Coll., 2003; Wollenweber et Coll., 2003; Fang et Coll., 2008**).

IV-ETUDE DES ATRIPLEX

IV.1. Étude botanique :

IV.1.1. Introduction :

Le genre *Atriplex* comporte à peu près 130 espèces d'*Atriplex*, originaires de toutes les régions tempérées et subtropicales du monde. Beaucoup sont des halophytes littorales (région méditerranéenne), d'autres des halophytes continentales, de déserts salés (Asie centrale, Amérique du Nord occidentale). Certains *Atriplex* sont des plantes annuelles (**Salgues, 1962**).

L'*A. halimus* est utilisé fondamentalement comme plante fourragère. Son feuillage persistant, riche en protéines, est très apprécié durant la longue période de sécheresse estivale, alors que les espèces herbacées ont disparu, elle est largement utilisée comme plante médicinale dans la pharmacopée traditionnelle (**Chalbi et Demarly, 1991**).

L'*A. halimus* est un genre d'arbuste annuel, vivace de la famille des chénopodiacées. Cette dernière comprenant environ une centaine d'espèces des régions tempérées et chaudes. Les espèces d'*Atriplex* poussent dans les sols légers, médiocres, arides; elles demandent une situation ensoleillée.

Elles résistent remarquablement aux sels marins et aux embruns. Il existe plusieurs espèces et variétés d'*Atriplex*. Entre autre, *A. canescens*, *A. portulacoides* L., *A. prostata*, *A. patula* L., *A. halimus* L. (**Bossard et Cuisance, 1984**). Par ailleurs, l'analyse botanique consacrée au genre *Atriplex* montre que *A. halimus* présente un polymorphisme plus important que celui des autres espèces du même genre. En effet, de nombreux travaux révèlent l'existence d'un polygame d'*Atriplex* au sein d'une station et ou entre stations (**Maire, 1962 ; Quèzel et Santa, 1963; Bossard et Cuisance, 1984; Talamali et Coll., 2001; Talamali et Coll., 2007**).

IV.1.2. Répartition géographique de l'*A. halimus* :

Les *Atriplex* se localisent dans les zones tempérées, méditerranéennes et subtropicales, entre 20 et 50° d'altitude Nord et Sud (**Le Houérou, 1992**). Elles poussent dans les régions arides et salines (**Kelly et Coll., 1982**). L'*A. halimus* est la plante indigène la plus représentée sur le pourtour méditerranéen. Elle est souvent en abondance sur le littoral de la Manche, et de l'océan (**Castroviejo et Coll., 1990 ; Martinez et Coll., 2003**).

IV.1.3. Description botanique de l'*A. halimus* :

A. halimus est un arbuste buissonneux d'un aspect blanc argenté de 1 à 2 mètres, étalé, très ample. Lorsqu'elle n'est pas soumise au pâturage, elle peut atteindre quatre mètres et constituer un fourré difficilement pénétrable par les animaux (**Nègre, 1961**). Il est connu à l'Ouest Algérien et au Maroc sous le nom de « Chenane », « Guettaf », « Aramass » (**Quèzel et Santa, 1963; Aboura, 2006**).

❖ **Tableau 5 : Description de *A. halimus* (Quèzel et Santa, 1963).**

| Partie de la plante | Description |
|----------------------------|---|
| Tiges | érigées-dressées, ligneuses |
| Feuilles | assez grandes, 2-5 cm, en général 2 fois plus longues que larges; oblongues ou ovales-obtuses. Valves fructifères coriaces, arrondies-rénifonnes, lisses. |
| Fleurs | Jaunâtres, en épis allongés formant une panicule terminale nue ou un peu feuillée à la base |



Fig. 28 : *A. halimus*

IV.2. Étude chimique :

Plusieurs travaux ont été effectués sur l'analyse chimique des extraits et des huiles essentielles de l'*Atriplex*. On signale entre autres les travaux de **Emam (2011)** sur les constituants bioactifs de l'*A. halimus* d'Égypte et ceux de **Benhammou et Coll. (1996)** sur les propriétés antioxydantes de principaux métabolites secondaires des feuilles et des tiges de l'*A. halimus*. Les résultats de cette dernière étude révèlent que les fractions de l'acétate éthylique et butanolique possèdent une forte capacité de donner l'hydrogène pour réduire le fer et une activité plus élevée à piéger le radical DPPH.

D'autre part, **Aharonson et Coll. (1969)** ont montré que l'extrait aqueux de l'*A. halimus* ainsi que le jus pressé des feuilles provoquent un effet hypoglycémiant chez des rats normaux et diabétiques. Par ailleurs, **Mertz et Coll. (1973)** ont prouvé que les cendres de l'*A. halimus* potentialisent l'effet de l'insuline (**Shani et Coll., 1972; Metz et Coll., 1973 ; McKell, 1994**).

La composition chimique de l'*A. halimus* dépend de plusieurs paramètres tels que le climat, l'âge de la plante et la saison (**Abbade et Coll., 2004**). Cette matière végétale est très riche en protéines, fibres, sels minéraux (**Esplin et Coll., 1937**), en vitamines A, C, et D (**Belenkii et Sakharova, 1939; Harie, 1947**) et saponines, alcaloïdes, flavonoïdes (**Emam, 2011; Roux, 2005**).

La composition en huile essentielle de l'*A. halimus* n'a fait l'objet d'aucune étude. En revanche, peu d'études ont été menées autour de la caractérisation chimique des huiles essentielles du genre *Atriplex*. La composition chimique de l'huile essentielle de l'*A. undulata* est marquée par ces majoritaires : *p*-acétanisole (28,1%), β -damascénone (9,3%), β -ionone (5,1%), viridiflorene (4,7%) et 3-oxo- α -ionol (2,2 %). L'activité antioxydante de l'huile a été également testée. Les résultats montrent que l'huile réduit le radical libre du DPPH. De plus, **Rodriguez et Murray (2010) et Jenis et Coll. (2010)** ont caractérisé le profil chimique de l'*A. tatarica*. L'étude montre qu'elle est constituée principalement de 1-méthoxy-4-(1-propényl) benzène (45,84%), heptacosane (9,82%), 1H-indol-5-ol(6,81%) et 2-méthylpropylester(4,03%).

Chapitre II :

ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES

Sommaire

I- INTRODUCTION

II- CHIMIE DES HUILES ESSENTIELLES

II.1. Composition chimique

II.2. Variabilité phytochimique

III- EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

IV- METHODES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

IV.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

IV.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse
(CPG/SM)

IV.3. Acquisition et traitement des données

I- INTRODUCTION

L'étude des huiles essentielles (HEs) est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. 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.

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

La notion de l'huile essentielle renvoie à une composition chimique très complexe et particulière, fortement concentrée, proposée conditionnée, ancestralement obtenue par extraction ou distillation des arômes naturels de la plante. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables. L'industrie des huiles essentielles est en constante évolution. Néanmoins, leur qualité dépend de plusieurs facteurs. Entres 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. On rapporte dans ce chapitre un bref rappel sur les concepts nécessaires à l'étude des huiles essentielles.

II- CHIMIE DES HUILES ESSENTIELLES

II.1. Composition chimique :

Senteurs, effluves, fragrances, essences, parfums autant de mots délicats pour nommer les substances aromatiques qui nous sont offertes par les plantes. De tout temps, le règne végétal a offert à l'Homme des ressources essentielles à son alimentation, à son hygiène et sa santé.

Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques (**Lucchesi, 2006**).

Les huiles essentielles existant dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs qu'elles dégagent. Elles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante : dans les feuilles (basilic), dans les fleurs (rose), dans le fruit (citron), dans les graines (coriandre), dans l'écorce (cannelle) et dans les racines (ail) (**Paltz, 1997**).

Les huiles essentielles sont extraites d'arbres, de buissons, de fleurs et d'arbustes originaires de toutes les régions du monde (**Walters, 1999**). Elles sont fabriquées à partir des sucres issus de la photosynthèse, par des cellules sécrétrices situées, le plus souvent, dans les fleurs et les feuilles. Plus récemment, la norme AFNOR NF T 75-006 (février 1998) a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (**Bruneton, 1999**).

Les huiles essentielles ont une composition assez complexe (**Azevedo et Ferri, 2001**) et éminemment variable de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et d'autre part le groupe des composés aromatiques dérivés du phényl propane (beaucoup moins fréquents). En effet, les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plus d'une centaine de composés, principalement des terpènes (**Cavalli, 2002**).

D'après la littérature plus de 30 000 terpènes sont connus jusqu'à présent. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (2-méthyl-1,3-butadiène : C_5H_8), ou par couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et trois unités concernant les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (**Vila et Coll., 2002 ; Newman, 1972 ; Pridham, 1967**).

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.). Les terpènes sont des hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur

formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100. La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (Tableau 6).

En général, une huile essentielle est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures (**Rhayour, 2002**). La structure varie en fonction du (**Pibiri, 2006**) :

- ❖ nombre d'atomes de carbone qui la constitue,
- ❖ caractère saturé ou insaturé des liaisons, et leur agencement : linéaire ou cyclique,
- ❖ la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...),
- ❖ la nature des groupes fonctionnels : terpènes, alcools terpéniques, cétones, phénols.

Tableau 6 : Nomenclature des terpènes (Marriotta et Coll., 2001)

| Nombre d'atomes | Unité d'isoprène | Nomenclature |
|-----------------|------------------|----------------------|
| 10 | 2 | Monoterpènes (C10) |
| 15 | 3 | Sesquiterpènes (C15) |
| 20 | 4 | Diterpènes (C20) |
| 25 | 5 | Sesterpènes (C25) |
| 30 | 6 | Triterpènes (C30) |
| 40 | 8 | Tétraterpènes (C40) |

II.2. Variabilité phytochimique :

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple : *Thymus* à thymol, géraniol, carvacrol et linalol) (**Cosentino et Coll., 1999**) et parmi les nombreux constituants d'une huile essentielle, l'un domine généralement ; on l'appelle composé majoritaire.

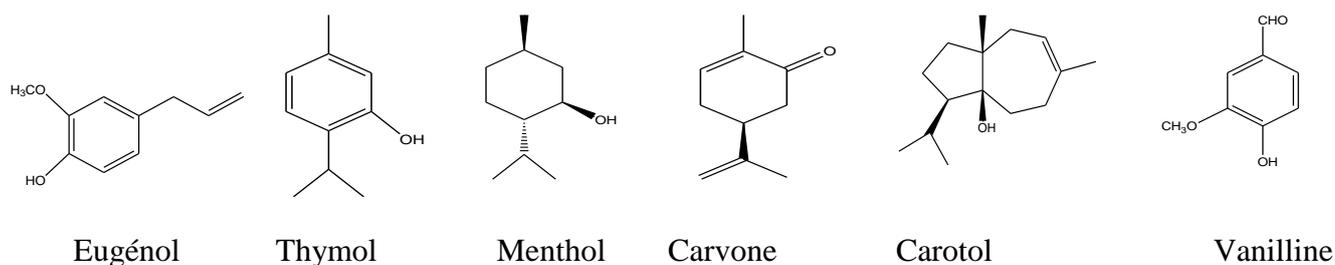


Fig.29 : Structure chimique de quelques composés extraits des huiles essentielles.

Selon les instituts de recherches des produits naturels, la composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. Nombreux travaux de recherche signalent l'impact des effets macroscopiques et microscopiques sur la composition chimique de l'huile essentielle.

En effet, sa composition chimique 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 de site de récolte. C'est le cas par exemple chez la *Tagetes lucida* dont l'huile essentielle est composée des phénylpropènes et des terpènes. Plusieurs études menées sur cette espèce montrent une variation importante dans la composition chimique. En effet, elles caractérisent plusieurs chémotypes: anéthol, estragol, méthyl eugénol, nérolidol (**Bicchi et Coll., 1997; Goehler, 2006**). 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 (**Figuerdo, 2007**). Un cas exemplaire, est le thym commun (*Thymus vulgaris*) dont la variabilité chimique est largement influencée par son environnement (sol, altitude, pression animale ou humaine) et le climat (température, pluviométrie, et ensoleillement). Le thym comprend alors 7 chémotypes différents : cinéol,

géraniol, linalol, terpinéol, thuyanol, thymol, et carvacrol. Chaque chémotype étant responsable d'effets qui lui sont propres et qui peuvent parfois se révéler antagonistes (**Baser, 2010**). On peut aussi citer le cas de *Ocimum gratissimum* L., qui peut présenter cinq chémotypes : eugénol, méthyl-eugénol, linalol, β -caryophyllène et géraniol (**Charles et Coll., 1992**). De nombreux travaux révèlent la variation de la composition en fonction de la période de récolte, par exemple la menthe poivrée récoltée en début de floraison a une huile essentielle riche en néomenthol et en menthone tandis qu'en fin de floraison cette huile est riche en menthol (**Bruneton, 1987**).

Une étude sud-africaine récente a révélé que les récoltes de géranium espacées de 8-12 semaines en période ensoleillée donnent de meilleurs résultats quantitatif et qualitatif (diminution du citronellol) (**Mosta, 2006**). D'autres recherches portent sur les huiles essentielles de géranium confirment l'impact des effets macroscopique et microscopique sur la composition de l'huile. En effet, la composition chimique des huiles essentielles a été affectée par le climat, les températures maximales et minimales, les périodes (estivale ou hivernale), la durée d'ensoleillement et le pic des radiations solaires, la pluviométrie, l'altitude, la nature du sol et son pH (**Boukhatemet Coll., 2010**).

III- EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

L'extraction des huiles essentielles est certainement la phase la plus délicate et la plus importante. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborées par le végétal. De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ses 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 la plus recommandée pour extraire les huiles essentielles des produits végétaux. Elle est très facile à mettre en œuvre. C'est une technique basée sur le changement d'état liquide-vapeur des espèces chimiques. Le principe de la méthode consiste, à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les composés volatils et semi-volatils sont entraînés par la vapeur d'eau, qui est ensuite condensée et collectée. Si la matrice extraite est riche en composés volatils, il se forme

un surnageant nommé huile essentielle, composée des produits volatils peu solubles dans l'eau (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**).

IV- METHODES D'ANALYSES DES HUILES ESSENTIELLES

A cause de l'importance des huiles essentielles dans le marché des cosmétiques et des parfums, les besoins de l'industrie de luxe ont conduit les chimistes à analyser les composants de diverses huiles essentielles qui sont des produits de base pour la fabrication de matières premières odorantes. Le développement de la technique dans notre monde industriel, ainsi que les exigences d'une législation de plus en plus complexe et sévère quant à la qualité et à la limitation des nuisances des produits industriels, confrontent le chimiste au double problème toujours croissant de la demande d'analyse et de leur complexité (**Laverdière et Coll., 1999**).

IV.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 dans l'analyse des huiles essentielles ; 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 (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**).

Dans un CPG, 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 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'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Barboni, 2006**).

IV.2. Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM):

L'identification des composés volatils caractéristiques des plantes aromatique nécessite l'utilisation de méthodes dites couplées. Les extraits à étudier sont généralement tellement

complexes que la simple utilisation des temps ou indices de rétention chromatographiques ne permet pas l'identification certaine des composés détectés.

Les méthodes couplées permettent d'associer la capacité séparative des méthodes chromatographiques (CPG, CLHP) au pouvoir de caractérisation des méthodes spectroscopique et spectrométrique (IR, RMN, SM). Ainsi, le couplage CPG/SM est devenu incontournable pour les laboratoires de recherche et contrôle qui étudient les huiles essentielles (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**). Le couplage CPG/SM impose peu de contraintes techniques. Seul l'hélium peut être utilisé comme gaz vecteur car les ions 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 de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (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 des 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, 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 inférieures 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 (**Arpino, 2008**).

IV.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 aromatisants. 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, d'une part le calcul des Ir, polaires et apolaires, et la quantification des composés par CPG/Ir et, d'autre par l'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants correspondants (**Paolini, 2005**) (Figure 30).

Les fragmentations du chromatogramme sont minutieusement analysées, il faut avoir une meilleure concordance entre le spectre de masses (composé recherché et composés proposés) 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'huiles essentielles.

En revanche, si le profil de l'huile est complexe ou qu'elle contient des composés pouvant coéluer ou encore lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche, dans ce cas, l'étude de l'huile nécessite un fractionnement, soit par chromatographie liquide sur colonne ouverte (CLC) ou chromatographie flash automatisée (CFA), ensuite les fractions obtenues sont analysées. Enfin, une troisième approche peut être mise en œuvre lorsque l'huile essentielle contient un ou plusieurs composés inconnus, qui n'existe pas d'ailleurs dans la bibliothèque conçue au laboratoire et ou dans les bibliothèques de la littérature, l'étude du profil oblige une purification soit par des distillations fractionnées ou par des techniques chromatographiques préparatives, tel que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC), la chromatographie liquide 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 résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H) et du carbone-13 (RMN-¹³C).

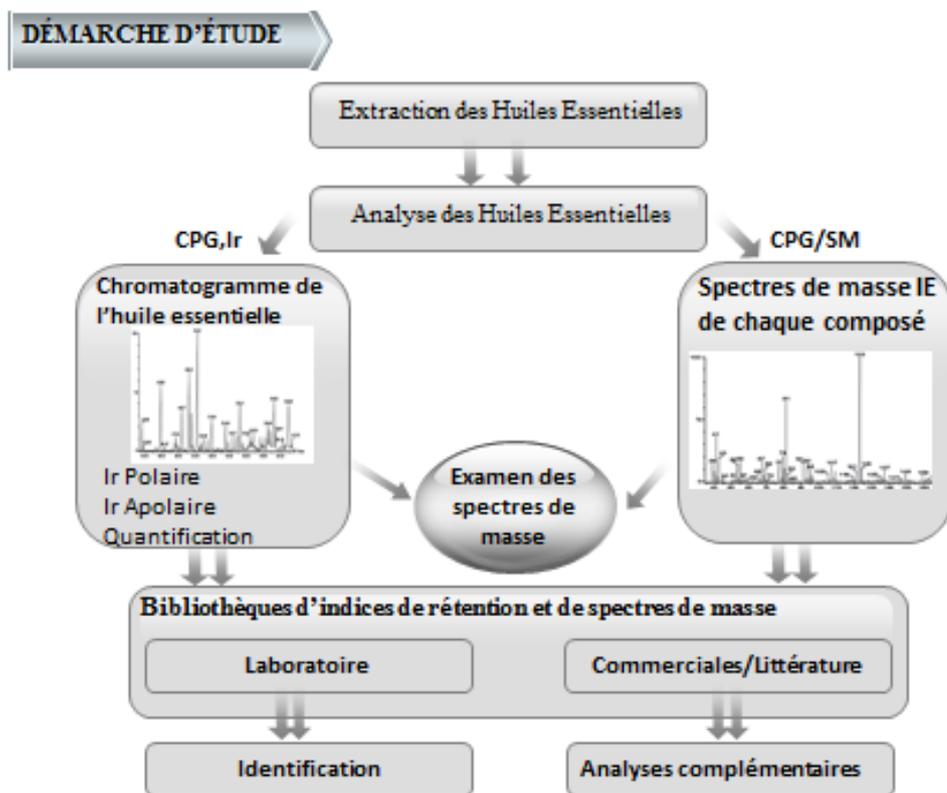


Fig. 30 : Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.

Chapitre III :
ETUDE DES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES
DES PLANTES MEDICINALES

Sommaire

I- ACTIVITE ANTIOXYDANTE

I.1. Généralités

I.2. Systèmes antioxydants

I.3. Techniques d'évaluation de l'activité anti-oxydante

I.3.1. Test de réduction du radical stable, **DPPH'**

I.3.2. Test de réduction du Fer (**FRAP**)

I.3.3. Test **ORAC**

I.4. Les antioxydants polyphénoliques

II.4.1. Introduction

II.4.2. Actions pharmacologiques des polyphénols

II.4.3. Relation entre les antioxydants et les polyphénols

II- ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

II.1. Généralités

II.2. Techniques d'évaluations de l'activité antimicrobienne

II.2.1. Méthode de diffusion sur disque

II.2.2. Méthode de dilution

II.2.2.1. Dilution en milieu liquide

II.2.2.2. Dilution en milieu solide

II.3. Facteurs influant sur l'activité antimicrobienne

II.3.1. Contact de la bactérie avec l'antibiotique

II.3.2. Etendue de l'inoculum

II.3.3. Composition et température du milieu

I-ACTIVITE ANTIOXYDANTE

I.1. Introduction :

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 (**Sanchez-moreno, 2002; Marc et Coll., 2004 ; Huang et Coll., 2005**).

L'utilisation des antioxydants synthétiques dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique est suspectée à long terme d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes (**Chavéron, 1999**). Plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant leur utilisation, leur substitution par des antioxydants naturels s'avère primordial. Les plantes sont une source des antioxydants naturels. Ces derniers sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs (**Elkalamouni, 2010**).

I.2. Système antioxydants :

Les entités oxygénées réactives oxydent lentement nos molécules biologiques. Heureusement, il existe un système de défense, le système antioxydatif. Ce réseau d'antioxydants, enzymatiques ou non, permet à notre corps de se défendre contre ces substances réactives oxygénées. On parle de stress oxydatif dès que le système antioxydatif n'est plus capable de prévenir les dégâts occasionnés par les substances oxygénées réactives. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Comhair et Erzurum, 2002**).

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 empêchés de poursuivre leurs œuvre 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 en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide

gras. Ces entités neutralisent directement ou indirectement les dérivés nocifs actifs de l'oxygène. 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 les trouver dans son alimentation, leurs existences est alors indispensables au bon fonctionnement de nos cellules (**Marcheix et Coll., 2005; Berset et Cuvelier, 1996 ; Rolland, 2004**).

Il existe deux types d'antioxydants :

– Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais, qui permettent l'interruption de la chaîne auto-catalytique : $AH + R^{\bullet} \rightarrow A^{\bullet} + RH$. La molécule AH est antioxydante si le radical formé A^{\bullet} est plus stable. La stabilité du radical A^{\bullet} peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires : $A^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow A-A$ ou $A^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow A-R$.

– Les antioxydants secondaires ou préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcools, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou des disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines ou enfin de séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique (**Rolland, 2004**).

I.3. Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante :

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, telles que le diabète, l'obésité, les maladies neurodégénératives, 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.

De plus, de nos jours, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ne sont pas standardisées. De nombreux facteurs entre en jeu. En effet, la méthode choisie est fortement liée aux paramètres réactionnelles : le solvant, le temps de réaction et le pH, etc. (**Magalhaes et Coll., 2008**).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle

par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Pour mieux prouver l'efficacité d'un antioxydant, il faut valider une série d'analyses, en mesurant les différents aspects et action d'un antioxydant. Il est également recommandé d'utiliser minutieusement des méthodes acceptées, validées et normalisées, avec des données, à la fois, comparables et disponibles dans la littérature.

Les méthodes peuvent varier selon la nature des radicaux libres, ainsi que selon les techniques analytiques impliquées dans le fonctionnement des processus d'oxydations. On décrit ci-dessous quelques méthodes d'analyse d'activité antioxydante *in vitro*.

I.3.1. Test de réduction du radical stable, DPPH :

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]) est un radical libre stable. Le DPPH[•] est caractérisé par une couleur violette (Blois, 1958), et présente un maximum d'absorption vers 517 nm dans une solution de méthanol ou d'éthanol (Brand-Williams et Coll., 1995). La stabilité de la molécule est assurée par la délocalisation des électrons sur l'ensemble de la molécule ce qui rend la molécule non dimérisable.

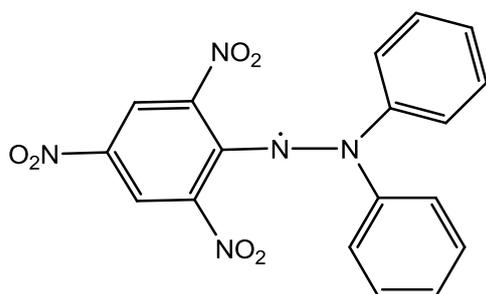


Fig. 31 :2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
(DPPH[•]) (violet)

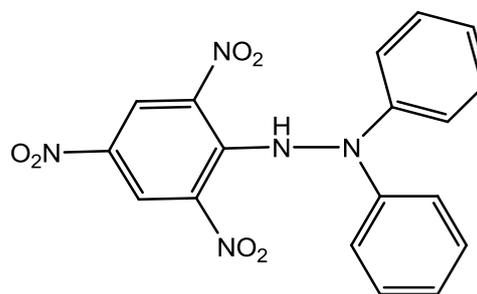
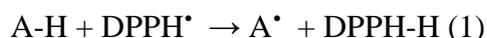


Fig. 32 :2,2-diphényl-1-picrylhydrazine
(DPPH-H) (Jaune)

La réduction du DPPH[•] par un donneur d'atome H (AH) conduit à la forme non radicalaire de couleur jaune (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine : DPPH-H) et au radical A[•]. En effet, plus le composé analysé a la tendance de donner son hydrogène au radical DPPH[•], plus son activité est jugée élevée (Molyneux, 2004).



La réaction (1) vise à assurer la liaison avec les réactions ayant lieu dans un système d'oxydation, tels que l'auto-oxydation d'un lipide insaturés ou toute autre substance. Le passage de la première

forme vers la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance. Le pourcentage de réduction de DPPH est exprimé par la relation suivante :

$$\% \text{ DPPH}_{\text{réduit}} = [(DO_{\text{contrôle}} - DO_{\text{E}}) / DO_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$DO_{\text{contrôle}}$: absorbance du DPPH à t_0 .

DO_{E} : absorbance après ajout de l'échantillon à tester.

Par définition, la concentration de substrat (acide ascorbique ou antioxydant), nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale en DPPH^{*}, est dite EC_{50} (exprimée en mg de substrat/g de DPPH).

Le composé à doser est ajouté à une solution alcoolique de DPPH^{*} (méthanol ou éthanol). La solution est placée dans l'obscurité. La réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH^{*} est suivie par spectroscopie visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH^{*} à 517 nm. De plus, le test consiste à ajouter une référence connue, et donc on pourra standardiser la méthode. Par exemple, on utilise un antioxydant standard (acide ascorbique) pour un control positif (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Portes, 2008**).

Cette méthode est rapide et peu coûteuse, c'est un simple procédé de spectrophotométrie. Elle est largement utilisée pour étudier les extraits végétaux et alimentaires et mesurer leur capacité antioxydante totale.

Le rapport DPPH^{*} /antioxydant doit être adapté à la stœchiométrie du composé (nombre de radicaux réduits par molécule antioxydante) et le DPPH^{*} doit être en excès. Le test permet de comparer un grand nombre de composés. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) évitent l'auto-oxydation et la dégradation des molécules mise en jeux. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH^{*}, pour une concentration en antioxydant donnée et un temps donné. L' EC_{50} calculée pour chaque antioxydant, permet de les classer entre eux. Plus l' EC_{50} est petite, plus la molécule est antioxydante (**Sanchez-Moreno, 2002 ; Portes, 2008**).

Une lecture minutieuse des publications montrent que les chercheurs utilisent des protocoles opératoires différents pour tester l'activité antioxydante. Plusieurs variations ont été enregistrés telles que : la concentration en DPPH (22,5 à 250 μM), le temps d'incubation de la réaction (5 min-1 h), le solvant de réaction, le pH du mélange réactionnel, la lumière et l'oxygène. D'ailleurs, en raison de l'impact de ses paramètres sur les valeurs d'absorption, les

résultats donnent des IC₅₀ très variables, et donc les résultats seront incomparables. Les différents facteurs sont résumés dans le tableau 7 suivant (Sharma et Coll., 2009).

Tableau7 : Variabilité des paramètres du test au radical libre DPPH.

| Paramètres d'étude | Références |
|---|--|
| DPPH ((μM) | |
| 22,5 | (Mimica-Dukic et Coll., 2004) |
| 50,0 | (Karioti et Coll., 2004) |
| 80,0 | (Eklund et Coll., 2005) |
| 100,0 | (Govindarajan et Coll., 2003 ; Chen et Coll., 2005, 2007) |
| 250,0 | (Alma et Coll., 2003 ; Kim et Coll., 2004) |
| Solvant | |
| Ethanol | (Karioti et Coll., 2004 ; Kano et Coll., 2005) |
| Méthanol | (Alma et Coll., 2003 ; Eklund et Coll., 2005) |
| Temps d'incubation (min) | |
| 5 | (Govindarajan et Coll., 2003) |
| 20 | (Karioti et Coll., 2004 ; Mimura et Yazaki, 2005) |
| 30 | (Alma et Coll., 2003 ; Kim et Coll., 2004) |
| 60 | (Karioti et Coll., 2004 ; Mimica-Dukic et Coll., 2004) |
| IC₅₀ de l'acide ascorbique | |
| 9,84 (56 μ M) | (Kano et Coll., 2005) |
| 110,77 (629 μ M) | (Ricci et Coll., 2005) |
| IC₅₀ de l'hydroxytoluènebutylé ou BHT | |
| 5,4 (25 μ M) | (Mimica-Dukic et Coll., 2004) |
| 19,8 (90 μ M) | (Sokmen et Coll., 2004) |
| 86,6 (393 μ M) | (Ricci et Coll., 2005) |

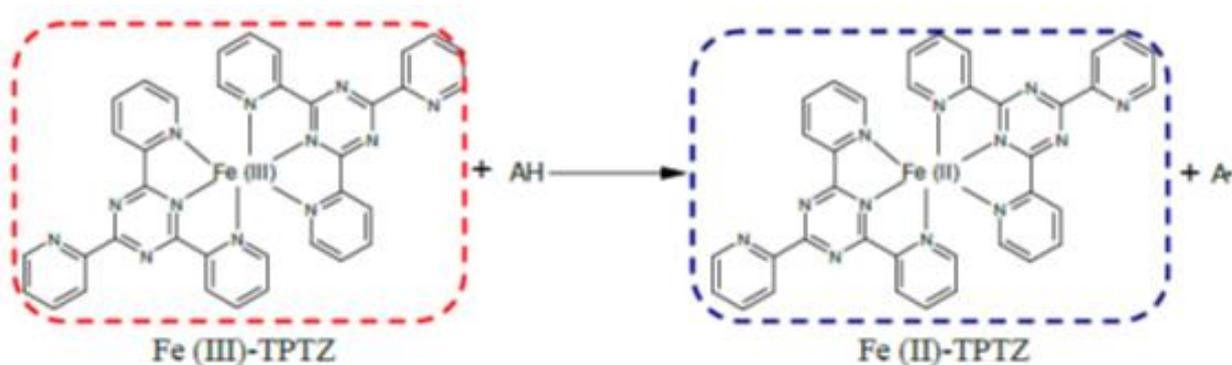
Le tableau ci-dessus démontre bien l'impact de différents paramètres sur les résultats obtenus. En outre, d'autres problèmes se posent à cause de l'instabilité du radical DPPH vis-à-vis de la lumière et de la température. Son absorbance à 517 nm décroît sans l'intervention d'un quelconque antioxydant (Ozcelik et Coll., 2003). D'autre part, de nombreux inconvénients limitent l'application du test DPPH, notamment :

- Insolubilité du DDPH dans l'eau rend le test non applicable dans le cas des antioxydants hydrophiles (Arnao et Coll., 2000).

- Certaines réactions avec le DPPH sont réversibles et peuvent mener à une fausse sous-estimation du potentiel d'activité. C'est le cas par exemple pour l'eugénol (**Huang et Coll., 2005**).
- Le DPPH ne réagit pas avec les flavonoïdes (qui ne contiennent pas de fonction alcool sur le cycle B).
- Enfin, les impuretés acido-basiques des solvants peuvent influencer sur l'équilibre d'ionisation de phénols et donc provoquer une diminution ou une augmentation des constantes d'équilibres (**Huang et Coll., 2005; Girard-lalancette, 2009**).

I.3.2. Test de réduction du fer (FRAP) :

La méthode de FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), a été initialement développée pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin, ensuite le test a été généralisé aux études des pouvoirs antioxydants des extraits de plantes (**Benzie et Strain, 1996; Iris et Coll., 1999; Nilsson et Coll., 2005**). Le dosage consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron. La variation de la coloration est mesurée par spectrophotométrie à 593 nm (**Benzie et Coll., 1999**). Le pouvoir réducteur d'un composé est associé à son pouvoir antioxydant, une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur (**Hubert, 2006**).



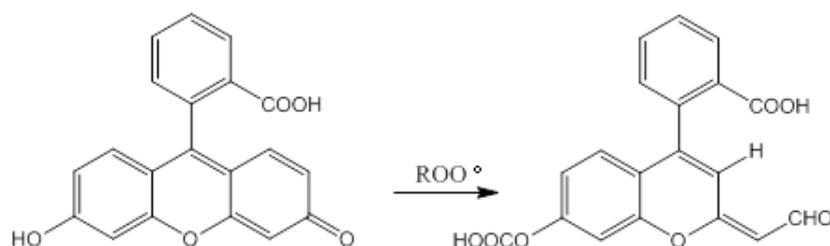
Mécanisme réactionnel du test de FRAP

La réaction est réalisée à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer. La réduction de Fe(III) en Fe(II) exprime la capacité antioxydante dans le test de FRAP. Cependant, les échantillons à tester peuvent contenir du Fe(III), ce qui rend les résultats des tests ambigus (**MacDonald-Wicks et Coll., 2006; Michel, 2011**).

I.3.3. Test d'ORAC :

Actuellement, la méthode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), s'impose comme une méthode de référence pour tester la capacité antioxydante *in vitro*. Le test est largement utilisé pour évaluer la capacité antioxydante des composés purs, des aliments et des boissons. Les normes internationales de sécurité alimentaire exigent la connaissance des indices d'ORAC dans le marché de l'industrie agro-alimentaire afin de connaître les capacités antioxydantes des aliments qu'on apprécie. Plus l'indice d'ORAC est élevé plus la capacité antioxydante du produit est forte. La méthode ORAC permet une mesure globale le pouvoir antioxydant de substances pures ou en mélange comme dans les produits finis.

Le protocole ORAC est défini comme étant un test pour estimer le potentiel à réduire les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) (Crichton et Coll., 2002). Initialement conçu avec la β -phycoerythrine (β -PE) comme fluorochrome, ensuite certaines modifications ont été introduites par le remplacement de la β -PE par de la fluorescéine, un indicateur non protéique et plus stable (MacDonald-Wicks et Coll., 2006). Le procédé emploie, habituellement, la fluorescéine et AAPH (2,2'-azo-bis 2-amidinopropane) en tant que molécule cible (TM) et le peroxyde source de radical, respectivement. Le test est basé sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH. Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant (Girard-lalancette, 2009).



Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC)

I.4. Polyphénols antioxydants:

I.4.1. Introduction :

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, impliqués dans de nombreuses facettes de leurs systèmes biologiques : pigmentation, mécanismes de croissance et de

reproduction, protection contre les prédateurs, ils peuvent intervenir et maintenir certains aspects de la physiologie de la plante. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. On le retrouve particulièrement dans les végétaux (fruits, légumes, céréales, etc.) et dans les produits qui en dérivent (thé, jus de fruits, etc.). Ils sont caractérisés par un cycle benzénique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles. Ils constituent un groupe de molécules très varié en fonction de leur structure et de leur degré de polymérisation, ce qui leur confère des activités biologiques différentes. À l'heure actuelle plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 appartient à la classe des flavonoïdes (**Robards et Coll., 1999; Sanoner et Coll., 1999 ; Sanoner, 2001 ; Dupas, 2005**).

I.4.2. Actions pharmacologiques des polyphénols :

Pour percer le mystère de ses biomolécules, de nombreux travaux ont été publiés. Ces derniers s'articulent autour de la caractérisation chimique et les propriétés pharmacologiques de polyphénols. Selon la littérature, les polyphénols ont un large spectre d'activité biologique. Ils ont des propriétés variées: antioxydante, antimicrobienne, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, et estrogénique (**Diebolt, 2003**).

Par ailleurs, les scientifiques ont constaté, que ces substances phénoliques sont capables d'inhiber les différentes étapes du processus de cancérisation, ainsi lutter contre le stress oxydatif, en piégeant les radicaux libres de nos cellules. Ils pourraient également induire des effets vasodilatateurs (**Kinsella et Coll., 1993**), exercer un effet antimicrobien (**I.S.L.I., 1999**) et une action antivirale par inhibition de la transcriptase inverse, stimuler le système immunitaire (**Formica et Regelson, 1995**), jouer un rôle protecteur dans plusieurs maladies neuro-dégénératives. Les chercheurs ont également prouvé que les polyphénols modulent l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires, en favorisant la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation les lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome (**Muanda, 2010**).

Pour certains chercheurs, l'action pharmacologique des polyphénols issus des végétaux, est associée à deux propriétés : d'une part, leur capacité à se lier aux protéines, ce qui peut conduire à l'inhibition des activités enzymatiques (lipoxygénase, peroxydases, xanthine oxydase, glucosidases, galactosidases, etc.) et d'autre part, leur caractère antioxydant permet de neutraliser les formes actives de l'oxygène ou des radicaux libres à caractère toxique issus de la peroxydation lipidique.

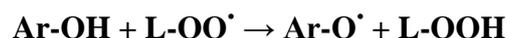
Ces résultats pourraient se révéler très utiles pour le développement des thérapies contre nombreuses maladies (**Marcheix et Coll., 2005**).

I.4.3. Relation entre les polyphénols et les antioxydants :

Les polyphénols suscitent depuis une quinzaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des épidémiologistes, des industriels de l'agroalimentaire et des consommateurs. Leur atout : protéger contre de nombreuses maladies telles que les cancers ou les maladies cardiovasculaires. Les polyphénols aident, notamment, à lutter contre la formation des radicaux libres dans le corps humain et, ainsi, à ralentir le vieillissement cellulaire.

Selon les études, les polyphénols sont des supports majeurs de l'activité antioxydante. Le profil antioxydant *in vitro* et *in vivo* d'un grand nombre de polyphénols est déjà largement étudié. Cette activité est directement liée à la structure phénolique qui confère à la molécule la capacité de générer des radicaux libres stabilisés par résonance. En effet, la formation des radicaux peut modifier les réactions oxydatives radicalaires générées chez les humains. Les polyphénols empêchent la formation de telles molécules oxydantes très réactives et provoquent leur élimination avant d'endommager les constituants de la cellule.

Les polyphénols possèdent des groupes hydroxyles phénoliques (Ar-OH). Ils peuvent donc fournir des hydrogènes aux radicaux peroxydes L-OO[•] (très instable) et les neutraliser. Le radical ArO[•] étant assez stable et moins réactif, va briser la chaîne:



Les composés phénoliques peuvent transférer un hydrogène du noyau phénol à un radical de haute énergie, comme par exemple les radicaux peroxydes, produits lors de l'auto-oxydation des lipides (**Dangles et Coll., 2003**). Le composé phénolique « radicalaire » résultant est stabilisé par la délocalisation des électrons sur le cycle benzénique. Cette réaction entraîne donc la conversion d'un radical peroxyde très réactif en un radical phénoxyde moins réactif. Cette capacité antioxydante (capture des espèces réactives de l'oxygène) est encore accrue pour les composés phénoliques possédant deux groupes hydroxyles en ortho. Ces derniers sont donc également plus sensibles à l'oxydation. La présence des groupements hydroxyles permettent également aux polyphénols d'agir en tant qu'acides faibles. En effet, la délocalisation des électrons sur le cycle benzénique permet une ionisation plus facile de la molécule. Ces groupements sont, par ailleurs, de bons donateurs d'hydrogènes pour la formation de liaisons hydrogènes. De nombreux composés phénoliques sont également chélateurs d'ions métalliques (**Bors et Coll., 1990**).

La diminution des concentrations d'espèces réactives de l'oxygène peut avoir plusieurs avantages qui pourraient être associés avec des systèmes de transport des ions et peuvent donc influencer sur les signaux d'oxydo-réduction. Cependant, l'activité antioxydante de polyphénols dépendra de plusieurs facteurs, parmi lesquels, on cite la biodisponibilité des polyphénols, leurs interactions avec les récepteurs de la cellule et l'activité enzymatiques.

II. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

II.1. Généralités :

Malgré les avancées spectaculaires dans les recherches pharmaceutiques, l'apparition et le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques est devenu un défi médical mondial. Les professionnels de la santé ne cachent pas leurs inquiétudes suite aux développements des bactéries multi-résistantes. Ces dernières provoquent des infections qui ne réagissent plus aux antibiotiques. Selon l'OMS, plus de 1,4 million de personnes dans le monde sont victimes des infections nosocomiales provoquées par les bactéries résistantes aux traitements et contractées lors des soins médicaux. Il est à noter que 70% des infections nosocomiales lourdes sont osseuses. Les fréquences maximales ont été rapportées dans les hôpitaux des régions de la Méditerranée orientale et de l'Asie du Sud-Est (11,8% et 10,0% respectivement), et la prévalence atteignait 7,7% en Europe et 9,0% dans le Pacifique occidental.

Par ailleurs, les plantes possèdent un système de défense naturelle très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires. Cette diversité, des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus. Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (**Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons et Coll., 2008**), d'où l'intérêt de la recherche et le développement de la phytothérapie. Justement 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. Ces travaux sont basés sur l'usage populaire des espèces natives. 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, la demande croissante à des méthodes de conservation des aliments avec 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'analyse de l'activité antibactérienne.

II.2. Techniques d'évaluations de l'activité antibactérienne :

II.2.1. La méthode de diffusion sur disque :

La méthode des disques est l'une des plus vieilles approches d'évaluation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier. La technique est basée sur le principe que les agents antimicrobiens, de concentration spécifique de chaque disque, diffuseront dans le milieu et inhiberont la croissance des microorganismes sensibles, résultant en une zone d'inhibition autour du disque. Cette technique 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 uniformémentensemencée d'une suspension de la bactérie étudiée.

Le principe de la technique est relativement simple. 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 fortes concentrations 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 seul les bactéries pathogènes, les plus sensibles, sont affectées (**Harley et Coll., 2010**). Les diamètres des zones d'inhibition permettent d'apprécier la sensibilité des germes. La lecture des résultats est rapportée par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en (mm). Les zones doivent être uniformément circulaires (**Richard et Coll., 2007**). Selon **Barros et Coll. (2007)**, l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- Diamètres inférieurs à 7 mm : *aucune activité antimicrobienne* (-),
- Diamètres de 7 à 9,9 mm : *activité antimicrobienne faible* (+),
- Diamètres de 10 à 11,9 mm : *activité antimicrobienne modeste* (+ +),
- Diamètres de 12 à 15 mm : *activité antimicrobienne élevée* (+ + +),
- Diamètres supérieurs à 15 mm : *activité antimicrobienne forte* (+ + + +)



Fig. 33 : Diamètre d'inhibition sur disque.

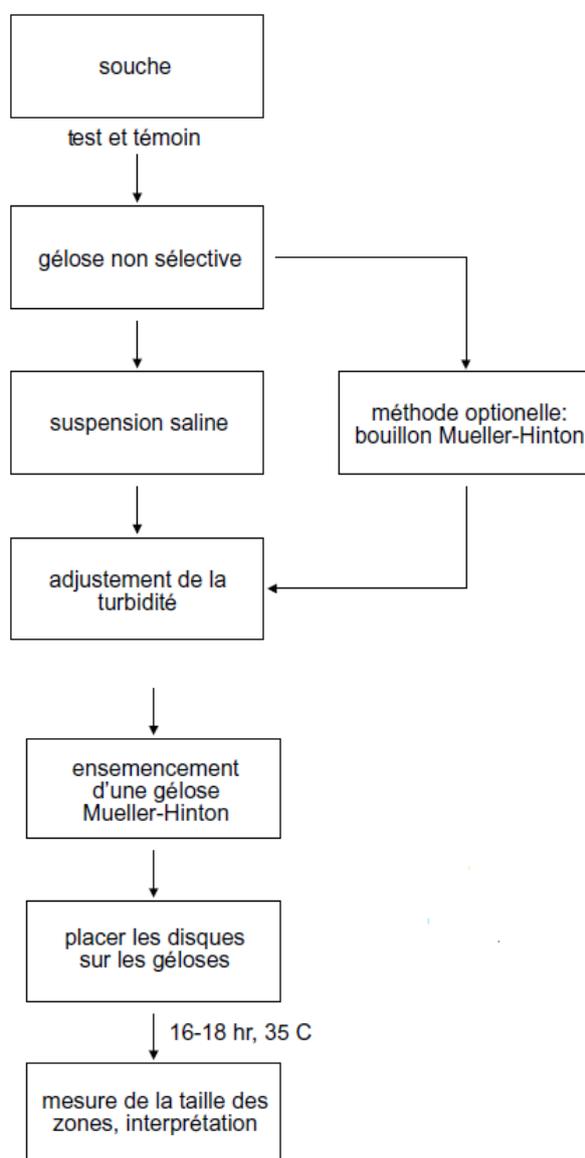


Fig. 34 : Procédure du test de la sensibilité aux antimicrobiens par la méthode des disques (NCCLS).

II.2.2. Méthode de dilution :

Grâce aux méthodes de dilution, on peut déterminer les valeurs de la CMI et de la CML (CMB). Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose et en bouillon. La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). Elle est confirmée par la recherche de la CMB. 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. La CMI d'un germe donné peut être mesurée par différents procédés (**CLSI-M7-A7, 2006**).

a) Dilution en milieu liquide :

Dans la méthode de dilution en bouillon, on distribue dans un premier temps une série de tubes à hémolyse (ou dans les cupules d'une microplaque), sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotique (en progression géométrique de 2). Puis on ajoute, dans un second temps, dans chacun des tubes (cupules), sous un même volume, des bactéries en phase exponentielle de croissance de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10^6 bactéries/ml. Après incubation durant 18 heures, les valeurs des CMI sont mesurées. Cette CMI est la plus petite quantité d'antibiotique (ATB) capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu. On détermine la CML (CMB) en transférant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance dans un milieu frais dépourvu d'antibiotique. La concentration d'antibiotique la plus faible à laquelle les micro-organismes ne se développent pas dans ce nouveau milieu est la CML (CMB) (**Jawetz et Coll., 1973 ; Harley et Coll., 2010**) (Figure35).

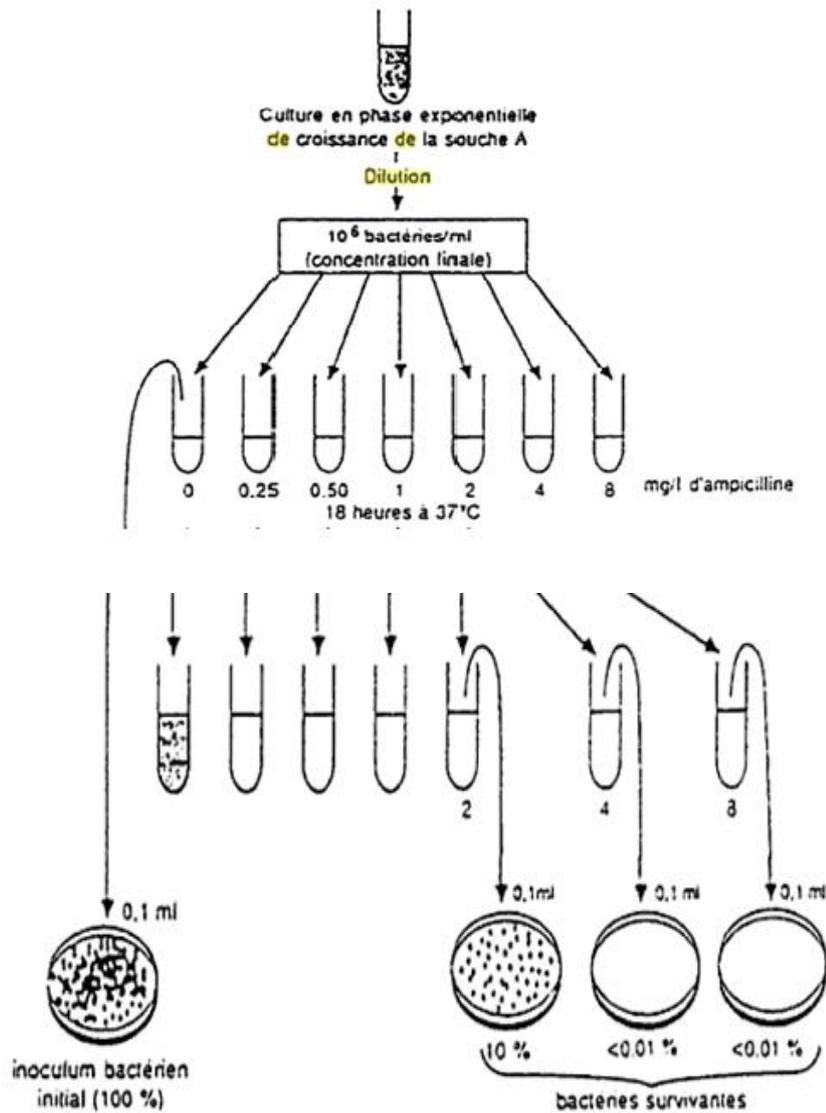


Fig. 35: Détermination de la CMI et de la CMB d'un antibiotique avec la méthode de dilution en milieu liquide.

b) dilution en milieux solide :

Le principe de la technique est le même qu'en milieu liquide, l'antibiotique est incorporé dans un milieu de culture solide (gélose) pour contrôler la croissance.

II.3. Facteurs techniques influant sur l'activité antimicrobienne :

II.3.1. Contact de la bactérie avec l'antibiotique :

Pour une appréciation correcte des résultats, il faut tenir compte de certains facteurs de variation dans les paramètres biochimiques. En effet, une petite variation de ces facteurs peut engendrer des résultats différents.

Parmi les nombreux facteurs qui influent sur l'activité *in vitro* : le pH, l'osmolarité, le poids moléculaire, la température du milieu, la concentration en cations divalents (en fonction des antibiotiques et en fonction des bactéries), la densité de l'inoculum et enfin la solubilité de l'échantillon dans le milieu.

Certains antibiotiques sont très actifs en milieu acide (par exemple la nitrofurantoïne), d'autres par contre sont actifs en milieu basique (par exemple la streptomycine)._Aussi et contrairement à la streptomycine, il est à noter que les huiles essentielles sont actives en milieu acide. Ce dernier leur permet une meilleure dissolution dans les lipides membranaires des bactéries cibles et donc une efficacité élevée (**Jawetz et Coll., 1973**).

II.3.2. Etendue de l'inoculum :

En générale plus l'inoculum bactérien est grand, plus la sensibilité apparente de l'organisme est faible. De grandes populations bactériennes sont moins rapidement et moins complètement inhibées que des petites. En outre, la probabilité de l'émergence d'une mutante résistante est beaucoup plus forte dans les grandes populations. Le CLSI recommande un inoculum final de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml pour les bactéries aérobies et un inoculum de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml pour les bactéries anaérobies.

II.3.3. Composition et température du milieu :

A température d'incubation, plusieurs composants actifs perdent le pouvoir antimicrobien. Par exemple, à cette température, la partie la plus volatile des huiles essentielles (les monoterpènes) peut facilement s'évaporer conduisant à une perte en composition chimique ce qui influe sur la fiabilité des résultats. Pour pallier à cette difficulté, de nombreux chercheurs utilisent le Tween-80 comme solvant dans le milieu de culture (**Inouye et Coll., 2000; Malecky, 2007**).

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV :

MATERIELS ET METHODES

Sommaire

I- CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

I.1. Provenance du matériel végétal et identification

I.2. Extraction des huiles essentielles

I.2.1. Hydrodistillation

I.2.2. Principe de l'hydrodistillation

I.2.3. Technique

I.3. Caractérisation des huiles essentielles

I.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

I.3.2. Couplage Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

I.3.3. Chromatographie sur colonne de silice

II- ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES

II.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

II.1.1. Technique de dilution (CMI)

II.1.2. Détermination des CMI par la méthode de dilutions

II.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante

II.2.1. Test de réduction du radical stable, le DPPH^{*}

II.2.2. Méthode de la réduction du fer (FRAP)

III- ETUDE PHYTOCHIMIE ET ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'*A. halimus*

III.1 Matériel végétal

III.1.1. Préparation de l'extrait aqueux brut

III.1.2. Tests phytochimiques

III.1.3. Dosage des phénols totaux

III.1.3.1. Principe

III.1.3.2. Protocole

III.2. Matériel animal

III.2.1. Toxicité aigüe

III.2.2. Induction du diabète chez les rats

III.2.3. Lots expérimentaux

III.2.4. Gavage de l'extrait

III.2.5. Suivi des animaux

III.2.6. Prélèvement du sang

III.2.7. Suivi à court terme

III.2.8. Test de tolérance au glucose

I. CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

I.1. Provenance du matériel végétal et identification :

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est récolté dans différents sites naturels de l'ouest d'Algérie (Tlemcen, Sidi Bel Abbès, Oran, Aïn-Témouchent). Il est prélevé dans des peuplements spontanés afin d'assurer l'homogénéité du matériel et d'étudier la variabilité en composition chimique.

Les échantillons sont identifiés par le Professeur Noury BENABADJI du laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes naturels de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen. On rapporte ci-dessous les coordonnées des sites de récoltes pour chaque espèce :

1- *P. sordidum* L.

Tableau 8 : Etude de la variabilité géographique de *P. sordidum* L.

| Région | Altitude(m) | Latitude | Longitude |
|------------------|-------------|---------------|--------------|
| S1: Oucheba | 832 | 34°52'15.57"N | 1°20'20.74"O |
| S2: Dzarifette | 1202 | 34°49'40.09"N | 1°22'59.37"O |
| S3: Ainfetouh | 1306 | 34°45'40.03"N | 1°22'44.89"O |
| S4: Misserghin 1 | 129 | 35°37'12.18"N | 0°43'25.40"O |
| S5: Misserghin 2 | 129 | 35°37'12.18"N | 0°43'25.40"O |
| S6: Mansourah | 1031 | 34°52'15.57"N | 1°20'20.74"O |

m: mètre

2- *P. saxatile*

Tableau 9 : Etude de la variabilité géographique de *P. saxatile*.

| Région | Altitude(m) | Latitude | Longitude |
|----------------------|-------------|---------------|--------------|
| A1: Welhassa | 309 | 35°14'44.38"N | 1°30'58.94"O |
| A2: Témouchent 1 | 143 | 35°17'34.61"N | 1°22'36.71"O |
| A3: Zwanef | 105 | 35°17'18.09"N | 1°26'8.36"O |
| A4 : Sidi Bel Abbès | 538 | 35° 1'35.19"N | 0°49'55.31"O |
| A5 : Témouchent 2 | 143 | 35°17'34.61"N | 1°22'36.71"O |
| A6 : Emir Abdelkader | 38 | 35°17'10.50"N | 1°21'38.64"O |

m: mètre

3- *C. villosa* subsp. *intermedia*

Tableau 10 : Etude de la variabilité géographique de *C. villosa* subsp. *intermedia*.

| Région | Altitude(m) | Latitude | Longitude |
|----------------|-------------|---------------|--------------|
| Mansourah : S1 | 1031 | 34°52'15.57"N | 1°20'20.74"O |
| Terni: S2 | 1368 | 34°47'0.00"N | 1°22'0.01"O |

m: mètre

4- *I. planifolia*

Tableau 11 : Région d'étude de l'*I. planifolia*.

| Région | Altitude(m) | Latitude | Longitude |
|---------------|-------------|----------------|---------------|
| Mansourah : S | 1031 | 34°52'15.57''N | 1°20'20.74''O |

m: mètre

5- *A. halimus*

Tableau 12 : Région d'étude de l'*A. halimus*.

| Région | Altitude(m) | Latitude | Longitude |
|----------------|-------------|----------------|--------------|
| Beni Ounif : S | 800 | 32° 02'49.96"N | 1°20'19.64"O |

m: mètre

I.2. Extraction des huiles essentielles :

Les recherches bibliographiques révèlent peu de travaux publiés sur la chimie et les activités biologiques des extraits des plantes sélectionnées. C'est la raison pour laquelle on a poursuivi les investigations, selon un protocole préétabli, afin de les valoriser. L'étude proposée a trait principalement à l'étude des huiles essentielles extraites des différentes parties des plantes étudiées (feuilles, fleurs et tiges) par hydrodistillation (Figure 36).

I.2.1. Hydrodistillation :

C'est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau. Elle peut être utilisée pour extraire des espèces insolubles dans l'eau.

I.2.2. Principe de l'hydrodistillation :

Son principe est le suivant :

- ✓ La substance contenant l'espèce volatile à extraire est mélangée avec de l'eau et l'ensemble est porté à l'ébullition.
- ✓ La phase gazeuse, contenant l'espèce volatile et la vapeur d'eau, arrive en haut de la colonne, passe dans le réfrigérant ensuite elle se condense.
- ✓ Le résultat de l'hydrodistillation est le distillat. Ce dernier comporte alors deux phases liquides, qu'on peut séparer par décantation (**Bagard, 2008**).

I.2.3. Technique :

La méthode d'extraction est décrite ci-dessous :

On place la matière végétale sèche : 400 g dans 4 litres d'eau distillée en utilisant un appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne (**Council of Europe, 1996**), puis on chauffe l'ensemble pendant 4 heures, après on récupère les vapeurs refroidies. Enfin, les huiles essentielles sont récupérées dans des flacons de verre scellés puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessous (Figure 36).



Fig.36 : Montage de l'hydrodistillation.

I.3. Caractérisation des huiles essentielles :

Une fois l'huile obtenue, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par deux techniques chromatographiques (CPG & CPG/SM).

Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants présents dans une huile essentielle. Les techniques chromatographiques sont les méthodes de référence dans l'analyse des huiles essentielles. Parfois, d'autres techniques spectroscopiques s'avèrent complémentaires.

L'identification des constituants est réalisée par l'utilisation des indices de rétention sur colonne polaire et 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 des données de la littérature (**König et Coll., 2001 ; National Institute of Standards and Technology, 2008**), et des bibliothèques commerciales (**National Institute of Standards and Technology, 1999 ; Adams, 2001 ; König et Coll., 2001**), et par l'analyse de chaque spectre de masse des composés constitutifs (utilisation de la banque « Arômes » constituée au LPN - Corse).

I.3.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus 600, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID), d'un 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 μm).
- Une colonne apolaire (Rtx-1, polydiméthylsiloxane).
- Le gaz vecteur est l'hélium ($1 \text{ ml} \cdot \text{mn}^{-1}$) 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 consiste en une élévation de 60 à 230°C, à $2^\circ\text{C} \cdot \text{mn}^{-1}$, puis en un palier de 45 mn à 230°C.
- L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50.
- La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,1 à 0,2 μl selon qu'elle soit pure ou diluée 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 d'étalon d'alcane allant de C₅ à C₃₀ en programmation de température.

I.3.2. Couplage CPG/spectrométrie de masse (CPG/SM) :

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, 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),

Ces deux colonnes sont couplées à un détecteur de masse quadripolaire Perkin Elmer TurboMass opérant dans les conditions chromatographiques décrites en I.3.1.

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 sous impact électronique (IE) à 70 eV.

I.3.3. Chromatographie sur colonne de silice :

Le fractionnement par chromatographie sur colonne de silice permet de simplifier le mélange complexe initial en séparant les composés par famille.

Le fractionnement des deux huiles essentielles de *P. sordidum* et *P. saxatile*, est réalisé en utilisant une chromatographie sur colonne de silice (CC) de type « flash » (ICN 200-500 µm). L'élution de l'huile est réalisée à l'aide d'un éluant de polarité croissante en utilisant un mélange binaire *n*-hexane/éther diéthylique.

II- ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES

II.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

II.1.1. Technique de dilution (CMI) :

Les tests sont effectués sur plusieurs souches bactériennes de référence (Laboratoire Antibiotiques, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAPSAB), Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen) : *Enterococcus faecalis* (ATCC 49452), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313). Le choix de ces bactéries est basé sur leur pouvoir de pathogénicité. Ces souches bactériennes sont des lots de « *American Type Culture Collection* » : ATCC. Il est à noter que l'activité antimicrobienne est évaluée par la Méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.

II.1.2. Détermination des CMI par la méthode de dilutions :

La technique utilisée est décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (CLSI-M7-A7, 2006).

Le Bouillon Muëller-Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence. A partir d'une préculture bactérienne en milieu solide (gélose nutritive) de 24 heures à 37°C, on a prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine qu'on a suspendues dans du bouillon nutritif. Elles sont, ensuite, placées dans une étuve à 37°C jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire de 10^8 cellules/ml (une DO de 0,08 à 0,1 ; $\lambda = 625$ nm). Une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ est effectuée pour avoir un inoculum final de 10^6 cellules/ml.

Après la préparation de l'inoculum de travail, on a inoculé la microplaque (96 puits), et on a utilisé 12 puits pour chaque souche antimicrobienne. A l'aide d'une micropipette de 100 μ l, on a

rempli les puits de 2 à 11 par 100 µl de milieu de test, et le puits 12 par 200 µl de même milieu, ensuite pour faire les dilutions, on a ajouté une quantité de 100 µl de solution mère de l'antimicrobien au puits 1 et 2. Après agitation, on a transvasé 100 µl à partir de puits 2 (qui contient maintenant un volume de 200 µl) dans le puits 3, et 100 µl de 3 à 4 jusqu'au puits 10, puis 100 µl de ce dernier puits sont rejetés. L'inoculation est la dernière étape dans la préparation de microplaque, pour cela, on a inoculé les puits de 1 à 11 par 100 µl d'inoculum de travail (CLSI-M27-A2, 2002; CLSI-M7-A7, 2006 ; Schwalbe, 2007).

Après une incubation de 16-20 h à 37°C, on a ajouté le *p*-iodonitrotétrazolium (INT), l'indicateur de croissance ou de viabilité des bactéries. Ce colorant est disponible sous forme de sel violet qui devient incolore une fois dissout dans l'eau.

Cet indicateur coloré est préparé en extemporané à 0,4 mg/ml dans l'eau distillée. 40 µl de la solution de INT sont rajoutés dans chaque puits. La microplaque est incubée à nouveau à 37°C pendant 30 minutes (Schwalbe, 2007).

Le tétrazolium joue un rôle d'accepteur d'électrons. Sous sa forme réduite, il prend une couleur rouge. Lorsqu'il est ajouté aux puits où il ya une croissance microbienne avec libération d'électrons, il se transforme sous une forme réduite et le contenu du puits devient rouge. Quand les bactéries sont inhibées, le contenu des puits reste clair (Al-bayati, 2008). La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). Il est à noter qu'on a utilisé la Gentamycine comme antibiotique de référence.

II.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante :

II.2.1. Test de réduction du radical stable, le DPPH[•] :

Utilisé en tant que réactif, DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazylhydrate) offre évidemment une méthode pratique et précise pour titrer les groupes oxydables d'origine naturelle ou synthétique antioxydants. 1 ml de 0,006% solution de DPPH dans l'éthanol est mélangé avec un volume égal d'extraits d'essai à différentes concentrations (0,04 à 0,2 mg/ml) et maintenu dans l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometer, Optizen POP).

- ✓ Le contrôle négatif est composé de 1ml de la solution éthanolique au DDPH et de 1 ml d'éthanol.
- ✓ Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé (**Molyneux, 2004**).

Expression des résultats :

- Calcul des pourcentages d'inhibition : On calcule ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante (**Sanchez-moreno et Coll., 2002**):

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

Avec : A_C : Absorbance du contrôle ;

A_T : Absorbance du test effectué.

- Calcul des IC_{50} : IC_{50} ou concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée EC_{50} pour *Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•. Les IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

- Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity): L'activité antiradicalaire est déterminée en calculant l'inverse des valeurs des IC_{50} : $A_{AR} = 1 / IC_{50}$

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures.

II.2.1 Méthode de la réduction du fer (FRAP) :

L'activité réductrice du fer des extraits préparés est déterminée selon la méthode décrite par (**Oyaizu, 1986**), basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} . 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 $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes 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 fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Benzie et Coll., 1996**).

III- ETUDE PHYTOCHIMIE ET ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'*A. halimus*

III.1 Matériel végétal :

L'*A. halimus* est une plante halophyte de la famille de chénopodiacées très répandue en Algérie. La plante est récoltée durant le mois d'Avril 2012 dans la région de Beni Ounif, située à 110 Km au nord-est de la ville de Béchar.

Les feuilles sont séparées et séchées à l'air libre. Après séchage, les feuilles sont broyées en poudre par un broyeur puis conservées jusqu'à l'utilisation.



Fig. 37 : *A. halimus* séché puis finement broyé.

III.1.1. Préparation de l'extrait aqueux brut :

L'extrait aqueux brut de l'*A. halimus* est préparé par décoction sous reflux de 10 g de la poudre dans 200 ml d'eau distillée pendant 30 min.

Le filtrat obtenu est séché à 50°C au four pasteur pendant 48 heures. Un résidu sec est obtenu. Il est conservé dans un tube en verre sec et propre. L'extrait aqueux ainsi préparé est utilisé au cours de l'examen phytochimique et de l'étude biologique.



Fig. 38 : L'extrait aqueux brut séché de l'*A. halimus*.

III.1.2. Tests phytochimiques :

L'examen phytochimique consiste à caractériser les différentes familles de métabolites secondaires présents dans la plante étudiées. Au cours de cette étude, on a procédé à des investigations sur l'extrait aqueux. Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et de complexation en employant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les essais phytochimiques sont menés en utilisant les méthodes usuelles décrites pour la plupart par **Harborne (1998)** :

- Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes sont mis en évidence par la réaction à la cyanidine.
- La caractérisation des tanins est faite par la réaction au chlorure ferrique.
- La recherche des alcaloïdes est réalisée à l'aide des réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes. Deux réactifs voire trois sont utilisés à savoir le réactif de Dragendorff, le réactif de Mayer et le réactif de Wagner.
- La recherche des saponosides est basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses contenant des saponosides de mousser après agitation.
- La recherche des stérols et des terpènes peut être réalisée par la réaction de Liebermann - Burchard.

III.1.3. Dosage des phénols totaux :

III.1.3.1. Principe :

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de **Folin-Ciocalteu (1927)** est la plus utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé.

III.1.3.2. Protocole :

Les polyphénols sont déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par **Folin-Ciocalteu (1927)**. 1 ml de l'extrait aqueux de la plante est mélangé avec 5 ml du réactif de **Folin-Ciocalteu (2M)** dilué 10 fois et 4 ml de carbonate de sodium ($\text{Na}_2 \text{CO}_3$) à concentration de 75g/l. L'absorbance est mesurée à 765 nm, après incubation pendant 1 heure à température ambiante. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, en suivant les mêmes étapes du dosage. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

La quantité des phénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$C = c.V/m$$

C : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique /g d'extrait plante).

c : concentration d'acide gallique (mg/ml).

V : volume de l'extrait (ml).

m : masse de l'extrait pur de plante (g).

III.2. Matériel animal :

En recherche biomédical, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de la biologie ou des comportements normatifs, ou d'un processus pathologique spontané ou induit ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain.

Dans cette étude, on a induit le diabète chez le rat *Rattus norvegicus*, variété Wistar, un mammifère de l'ordre des Rongeurs de la famille des Muridés (**Stephens, 2008**).

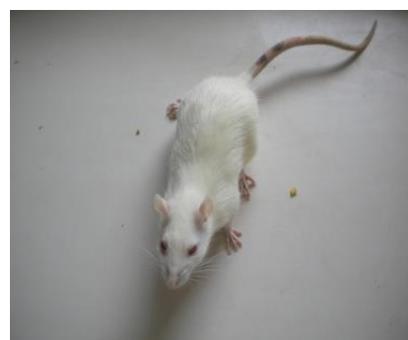


Fig.39 : Rat wistar

Les rats sont âgés de 3 mois avec un poids qui varie entre 220-280 g. Ils sont maintenus dans une température contrôlée 24-30°C. Tous les rats sont soumis au même régime alimentaire ONAB (Office National d'Aliments de Bétails).

III.2.1. Toxicité aigüe :

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il est nécessaire de réaliser des essais de toxicité. Pour cela, une forte dose de l'extrait aqueux de l'*A. halimus* solubilisé dans le tween 80,3 g/kg est testée sur 4 rats. L'administration est réalisée par voie orale.

III.2.2. Induction du diabète chez les rats :

La streptozotocine (STZ) est une toxine ayant la capacité d'induire la destruction sélective de la cellule bêta du pancréas entraînant une carence en insuline et l'hyperglycémie. C'est un antibiotique produit par *Streptomyce sachromogenes*.

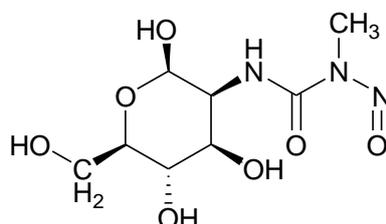


Fig. 40 : Structure de la streptozotocine.

La solution de la STZ est préparée dans le tampon citrate 0,1 M (pH 4,5) à raison de 50 mg/kg. Du fait de son instabilité en solution ainsi qu'à température ambiante, la STZ doit être préparée juste avant l'injection. Il est déconseillé de conserver la solution même à basse température (**Chen et Ianuzza, 1981**). L'injection se fait à jeun après anesthésie par le chloral hydraté (4%) à raison de 200 mg/kg de poids corporel par voie intrapéritonéale (**Calapai, 1999**).



Fig. 41: Anesthésie par voie intrapéritonéale.



Fig. 42: Injection de streptozotocine par voie intraveineuse.

La streptozotocine est capable d'induire une hypoglycémie fatale résultante d'une sécrétion pancréatique massive de l'insuline (**Palsamy et Subramanian, 2008**). Après administration de la STZ et pour prévenir son effet fatal, les biberons sont remplis de solution de saccharose à 8% pendant 24 heures.

Après une semaine, le diabète expérimental est confirmé chez les rats en mesurant la glycémie à l'aide d'un glucomètre. Les rats qui ont un taux de glucose sanguin supérieur à 1,70 g/l sont utilisés dans l'expérimentation.

III.2.3. Lots expérimentaux :

Les rats sont repartis en quatre lots de 5 rats :

Lot1 : diabétiques témoins recevant du tween 80 à 5%.

Lot2 : diabétiques traités par 200 mg/kg d'extrait aqueux.

Lot3 : normaux témoins recevant du tween 80 à 5%.

Lot4 : normaux traités par 200 mg/kg d'extrait aqueux.

III.2.4. Gavage de l'extrait :

Quotidiennement, l'extrait sec est solubilisé dans une solution de tween 80 à 5% (0,2 g de résidu sec dans 10 ml de tween 80 à 5%), puis administré aux rats, par voie orale, à raison de 200 mg/kg de poids corporel.



Fig. 43: Gavage

III.2.5. Suivi des animaux :

Après confirmation du diabète, les rats sont suivis pendant quatre semaines. Le suivi consiste en une mesure de la glycémie à la fin de chaque semaine ainsi que la prise du poids corporel tous les jours. Après, on réalise l'analyse des protéines totales.

III.2.6. Prélèvement du sang :

Le sang est prélevé, après un jeun de 16 heures sans anesthésie, à l'aide d'une pipette pasteur préalablement rincée avec l'anticoagulant EDTA à 0,1% à travers le sinus rétro-orbital au niveau de l'œil des rats (**Babu, 2003**). Le sang récupéré est utilisé pour mesurer la glycémie à l'aide d'un glucomètre.

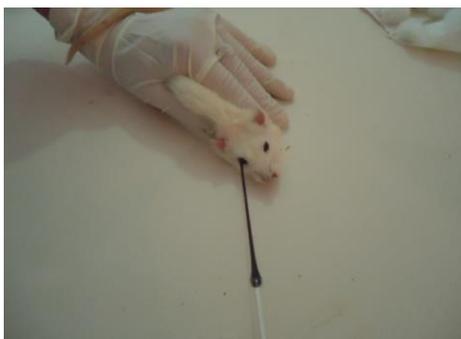


Fig. 44: Prélèvement du sang dans le sinus rétro-orbitale.

III.2.7. Suivi à court terme :

Durant la troisième semaine et afin de déterminer l'effet antidiabétique de l'extrait aqueux, la glycémie des rats des quatre lots est suivie pendant 3 heures après gavage de l'extrait (200 mg/kg).

III.2.8. Test de tolérance au glucose :

A la quatrième semaine et afin d'évaluer l'effet antidiabétique de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*, les rats des quatre lots sont soumis à un test de tolérance au glucose réalisé par gavage d'une solution de glucose à 30% à raison de 3 g/kg du poids corporel. Des prélèvements sanguins pré et post ingestion sont, ensuite, réalisés à t_0 (basal), t_1 (60 mn), t_2 (120 mn) pour mesurer la glycémie.

Chapitre V :

***CARACTERISATION DES COMPOSES VOLATILS
DE CINQ PLANTES AROMATIQUES***

Sommaire

I- INTRODUCTION

II- HUILE ESSENTIELLE DE *Phagnalons*.

II.1. Analyse des huiles essentielles des *Phagnalons*

II.2. Variabilité chimique

II.3. Composition chimique des H.E en fonction du cycle végétatif :

III- HUILE ESSENTIELLE DE *C. villosa* subsp. *Intermedia*

III.1. Extraction des huiles essentielles

III.2. Caractérisation des huiles essentielles

IV- IV- HUILE ESSENTIELLE DE *L'I. planifolia*

IV.1. Extraction des huiles essentielles

IV.2. Caractérisation des huiles essentielles

V. HUILE ESSENTIELLE DE *L'A. halimus*

V.1. Extraction des huiles essentielles

V.2. Caractérisation des huiles essentielles

I- INTRODUCTION

Malgré les progrès considérables réalisés ces dernières années dans le domaine de la chimie analytique, la caractérisation des huiles essentielles demeure un challenge. En effet, l'identification des constituants d'une huile essentielle est une opération délicate nécessitant l'utilisation, l'adaptation et le perfectionnement des techniques d'analyses ainsi, que la mise en œuvre d'une méthodologie d'analyse rigoureuse.

Le but premier de ce chapitre, est de décrire les compositions chimiques des huiles essentielles des cinq plantes qui font l'objet de notre étude, deux *Astéraceae*, une *Fabaceae*, une *Iridaceae* et une *Chenopodiaceae*. Pour cela, on a mis en œuvre la méthodologie d'analyse développée au laboratoire et décrite précédemment au chapitre IV.

II- HUILE ESSENTIELLE DE *PHAGNALONS* :

II.1. Analyse des huiles essentielles des *Phagnalons* :

Les deux *Phagnalons* étudiés, notamment le *P. sordidum* et de *P. saxatile*, sont récoltés entre avril et mai 2010, dans différentes stations (S1-S5 & A1-A5) de l'ouest algérien où ils poussent en abondance. Les parties aériennes fraîches sont, ensuite, séparées puis introduites dans le ballon (6 litres) d'un appareillage de type Clevenger. Après 5 heures d'hydrodistillation, les rendements des extractions sont compris entre 0,01 et 0,06%.

Les huiles essentielles collectées des parties aériennes de *P. sordidum* et de *P. saxatile* sont analysées par CPG-Ir et CPG/SM-IE. Leurs profils chromatographiques respectifs sont représentés sur les figures 45 et 46. Les analyses ont permis d'identifier 74 et 79 composés représentant 93,1% et 87,7% des compositions chimiques des huiles essentielles collectives obtenues respectivement (Tableaux 14 & 15). 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.

Les huiles essentielles des *Phagnalons* sont des mélanges complexes. De nombreux constituants sont présents en faible proportion. En outre, d'autres composés coéluent entre eux (Figure 45 & Figure 46). Pour mieux identifier ses composés, on a entrepris un fractionnement sur colonne de silice (de type « flash ») de chaque huile collective afin de caractériser un plus grand nombre de composés.

Le fractionnement des huiles essentielles est réalisé avec un mélange *n*-pentane/diéthyle éther comme éluant. Les résultats du fractionnement de chaque huile de *Phagnalons* révèlent trois fractions (Tableau 13). Les analyses de ces fractions (Figure 47 & Figure 48), selon la séquence habituelle CPG-Ir et CPG/SM-IE, ont permis d'identifier respectivement 58 et 55 composés supplémentaires.

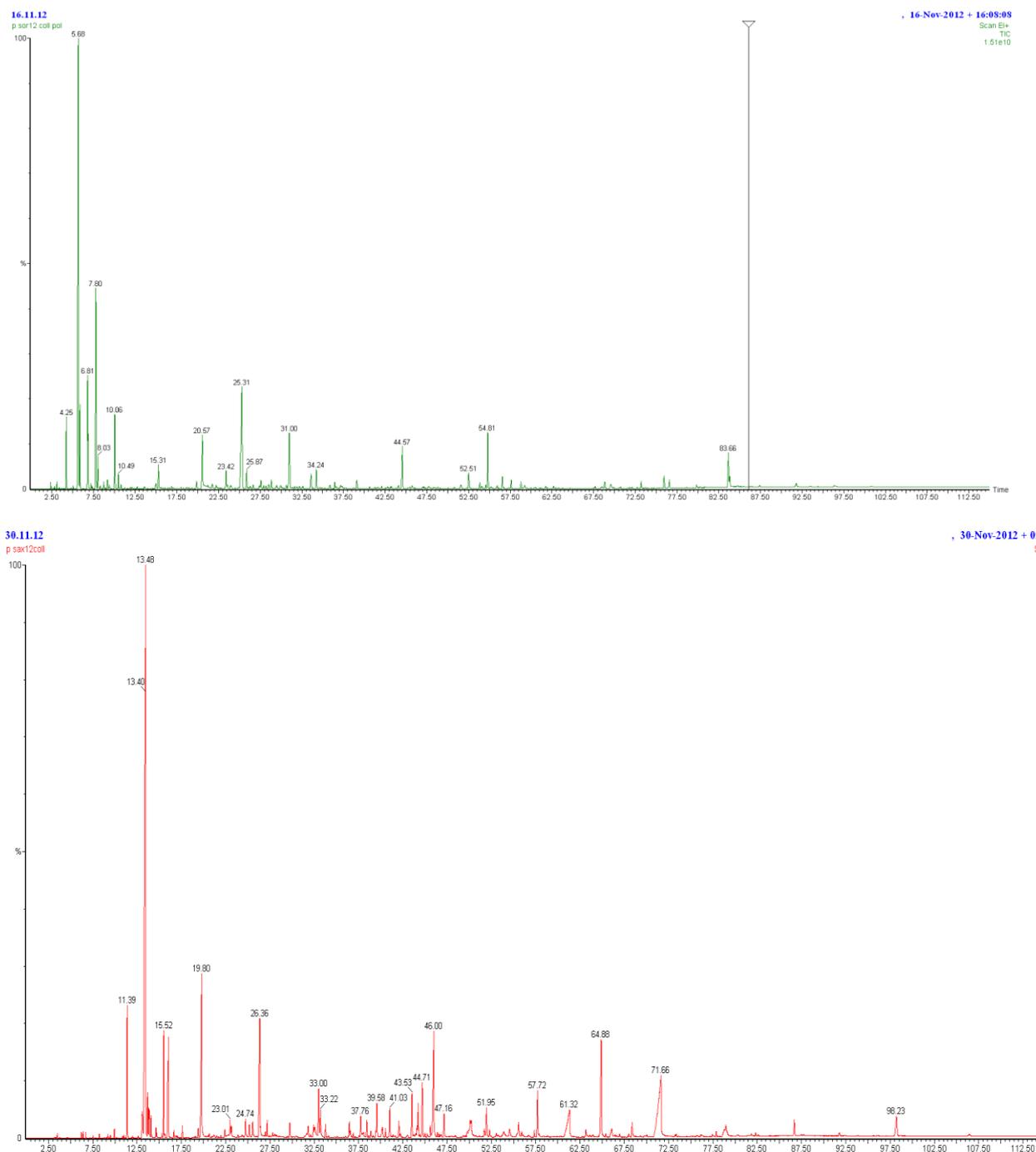


Fig.46: Chromatogramme de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. saxatile*.

Tableau 13: Apport de la chromatographie flash à l'identification des constituants des huiles essentielles de *Phagnalons*.

| Fractions obtenues | Nbre de composés identifiés | Taus d'identification |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>P. sordidum</i> | Avant Fractionnement : 74 | Avant Fractionnement : 93,1% |
| | Après Fractionnement : 132 | Après Fractionnement : 98% |
| <i>P. saxatile</i> | Avant Fractionnement : 79 | Avant Fractionnement : 87,7% |
| | Après Fractionnement : 134 | Après Fractionnement : 93% |

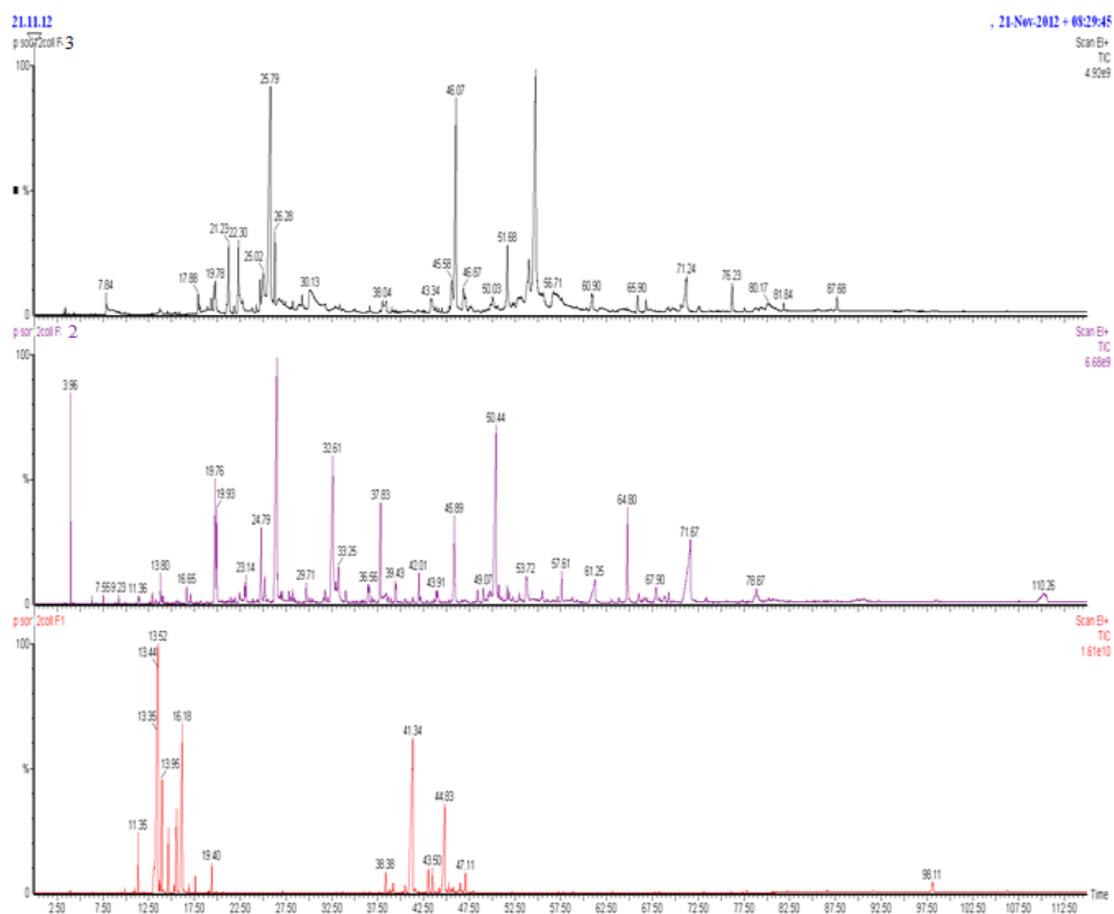


Fig.47: Chromatogrammes des fractions (F1, F2, et F3) de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. sordidum* L.

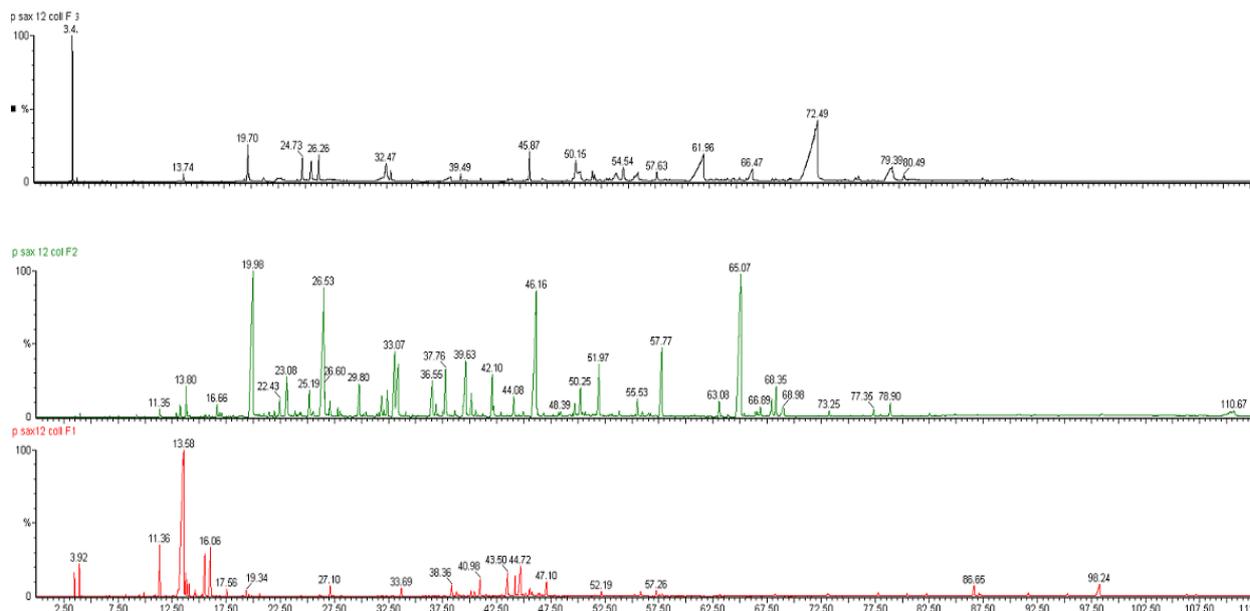


Fig.48 : Chromatogrammes des fractions (F1, F2, et F3) de l'H.E de *P. saxatile*.

L'analyse détaillée de l'huile de *P. sordidum* L., après fractionnement, a conduit à l'identification de 132 constituants représentant un pourcentage de caractérisation de 98%.

Tableau 14: Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. sordidum* L.

| N° | Composés ^a | RI _a ^b | RI _a ^c | RI _p ^d | H.E ^e | H.E ^f | F1 | F2 | F3 | Identification ^g |
|----|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------------------|
| 1 | Hexanal | 780 | 775 | 1076 | 0,1 | - | - | 0,1 | - | RI, MS |
| 2 | Octane | 800 | 800 | 800 | tr | - | 0,1 | - | - | RI, MS |
| 3 | (E)-2-Hexenal | 832 | 832 | 1213 | 0,1 | - | - | 0,1 | - | RI, MS |
| 4 | (Z)-3-Hexène-1-ol | 851 | 844 | 1342 | 0,5 | 0,5 | - | - | 1,3 | RI, MS, Réf1 |

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). ^bRI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005. ^cRI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique. Pourcentages des composés : ^eComposition chimique de l'huile essentielle analysée après le fractionnement ; ^fComposition chimique de l'huile essentielle analysée avant le fractionnement. ^gComposés identifiés à partir des données de la littérature König et Coll., 2001 et des données du NIST.

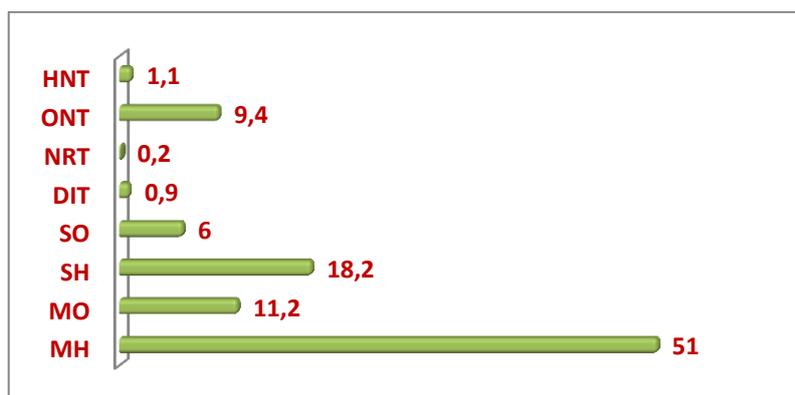
Par ailleurs, l'étude détaillée du profil de l'huile de *P. saxatile* a permis d'identifier 134 composés qui représentent un pourcentage de caractérisation de 93% de la composition totale de l'huile collective.

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. saxatile*.

| N° | Composés ^a | RI _a ^b | RI _a ^c | RI _p ^d | H.E ^e | H.E ^f | F1 | F2 | F3 | Identification ^g |
|----|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|------------------|-----|-----|-----|-----------------------------|
| 1 | Hexanal | 780 | 780 | 1074 | 0,1 | 0,1 | - | 0,1 | - | RI, MS |
| 2 | Octane | 800 | 800 | 800 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | - | - | RI, MS |
| 3 | (E)-2-Hexenal | 832 | 832 | 1216 | 0,1 | - | - | 0,1 | - | RI, MS |
| 4 | (Z)-3-Hexène-1-ol | 851 | 845 | 1341 | 0,1 | 0,1 | - | - | 0,2 | RI, MS, Réf1 |
| 5 | 1-Hexanol | 855 | 850 | 1340 | 0,1 | 0,1 | - | - | 0,1 | RI, MS |

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). ^bRI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005. ^cRI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique. ^dPourcentages des composés. ^eComposition chimique de

l'huile essentielle analysée après le fractionnement. ⁴Composition chimique de l'huile essentielle analysée avant le fractionnement. ⁵Composés identifiés à partir des données de la littérature **König et Coll., 2001** et des données du NIST.

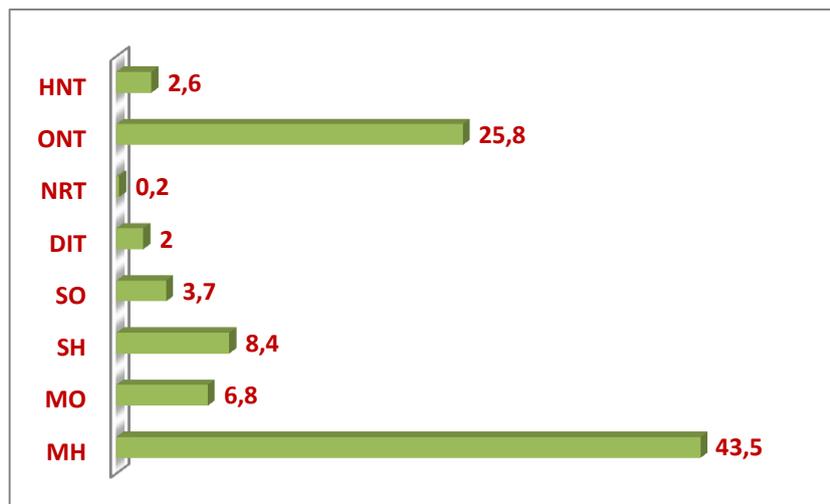


Histogramme 1: Composition chimique de l'huile collective de *P. sordidum* L.

La lecture de Tableau 14 a permis de tracer l'histogramme 1. Ce dernier illustre les différentes classes des composés caractéristiques de l'huile de la partie aérienne de *P. sordidum* L. Les analyses chromatographiques (CPG-Ir & CPG/SM-IE) révèlent que :

- L'huile essentielle de la partie aérienne de *P. sordidum* L., est principalement dominée par la classe des monoterpènes hydrocarbonés (51,0%). On note que cette famille est caractérisée par l'abondance du β -pinène (25,6%). Les sesquiterpènes hydrocarbonés (18,2%) sont nettement dominés par le (*E*)- β -caryophyllène (10,2%).
- Une autre classe de composés très présente dans l'huile essentielle est celle des monoterpènes oxygénés (11,2 %) dont le majoritaire est le thymol (3,9 %).
- D'autres classes sont présentes telles que :
 - ❖ Les oxygénés non terpéniques (9,4 %), cette classe est dominée par le décanal (4,5%).
 - ❖ Les sesquiterpènes oxygénés (6,0%), le composé principal est l'oxyde de caryophyllène (3,0%).
- On révèle, en outre, la faible présence de ces deux classes ci-dessous:
 - ❖ Les nor-terpéniques (0,9%),
 - ❖ Les diterpènes (0,2%).

Concernant l'huile essentielle de la partie aérienne du *P. saxatile*, les résultats mentionnés dans le Tableau 15, permettent de tracer l'histogramme 2.



Histogramme 2: Composition chimique de l'huile collective de *P. saxatile*.

L'histogramme 2 montre les classes de composés caractéristiques de l'huile essentielle de la partie aérienne de *P. saxatile*. Les analyses chromatographiques (CPG-Ir & CPG/SM-IE) révèlent que :

- L'huile essentielle de *P. saxatile* est caractérisée par la prédominance des monoterpènes hydrocarbonés (43,5%) avec le β -pinène (31,3%) comme composé majoritaire.
- Le profil de l'huile essentielle du *P. sordidum* se caractérise aussi par sa richesse en sesquiterpènes hydrocarbonés (18,2%). Cependant, pour *P. saxatile* la classe des sesquiterpènes hydrocarbonés (8,4%) est faiblement dominante. En revanche, on observe une augmentation du pourcentage des composés oxygénés non terpéniques (25,8%) pour l'huile de *P. saxatile*, due à l'apparition à la série d'aldéhydes linéaires.

L'établissement des profils chimiques par CPG-Ir et CPG/SM-IE des huiles essentielles des plantes étudiées révèlent que le *P. sordidum* est riche en monoterpènes hydrocarbonés (51%) et sesquiterpènes hydrocarbonés (18,2%). En revanche, le *P. saxatile* est riche en monoterpènes hydrocarbonés (43,5%) et en oxygénés non terpénique (25,8%).

Cette étude montre que le profil chimique de l'huile essentielle de *P. sordidum* L., se rapproche de celui du *P. saxatile* d'origine turque. En effet, cette dernière rapporte que l'huile de *P. saxatile* est dominée par β -pinène (5,4%), limonène (3,5%), *p*-cymène (2,1%), caryophyllène (4,6%), γ -cadinène (3,0%), aromadendrène (2,2%) et l'acide hexadécanoïque (17,4 %). Aussi, on signale l'abondance des acides dans l'huile d'origine turque (Senatore et Coll., 2005).

Il est à noter que les compositions chimiques des *Phagnalons* étudiés sont différentes de celles des huiles essentielles du *P. graecum* décrites dans la littérature (Erdogan Orhan et Coll., 2012). L'huile essentielle *P. graecum* renferme principalement : germacrène-D (21,3%), acétone

hexahydrofarnesyl (9,6%), β -caryophyllène (9,4%), acide hexadécanoïque (6,1%), oxyde de caryophyllène (6,0%) et δ -cadinène (3,2%).

II.2. Variabilité chimique :

Dans le but de déceler une éventuelle spécificité régionale ou micro-régionale en vue d'une valorisation des huiles étudiées. On a entrepris une étude autour de la variabilité chimique des huiles essentielles de *P. sordidum* et *P. saxatile* récoltés dans différentes régions de l'ouest d'Algérie.

Les deux plantes sont cueillies dans cinq stations (S1-S5, A1-A5) réparties sur l'ensemble de l'ouest d'Algérie :

P. sordidum L.: {S1: Oucheba, S1: Dzarifette, S3: Ain fetouh, S4: Misserghine1, S5: Misserghine2}

P. saxatile : {A1: Welhassa, A2: Témouchent1, A3: Zwaneff, A4 : Sidi Belabbes, A5 : Témouchent2}

Les analyses ont été menées par CPG-Ir et CPG/SM-IE. Les résultats des analyses sont regroupés dans les Tableaux 16 et 17.

Tableau 16: Compositions chimiques des huiles essentielles de *P. sordidum* L. dans diverses localités de l'ouest d'Algérie.

| N° | Composés ^a | RI _L ^b | RI _a ^c | RI _p | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | MAX | MIN | Identification |
|----|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|----------------|
| 1 | Hexanal | 780 | 775 | 1076 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | tr | 0,1 | 0,2 | 0,1 | RI, MS |
| 2 | Octane | 800 | 800 | 800 | tr | tr | - | - | - | - | - | RI, MS |

^aOrdre d'éluion est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). ^bRI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005. ^cRI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique ; ^dPourcentages des composés. Station : (A1-A5), A1 : welhassa, A2: Témouchent1, A3: Zwaneff, A4: Sidi bel Abbès, A5: Témouchent2; Réf1, Composés identifiés à partir des données de la littérature König et Coll., 2001; Réf2, Composés identifiés des données du NIST.

Tableau 17: Compositions chimiques des huiles essentielles de *P. saxatile* dans diverses localités de l'ouest d'Algérie.

| N° | Composés ^a | RI _L ^b | RI _a ^c | RI _p | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | MAX | MIN | Identification |
|----|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|
| 1 | Hexanal | 780 | 780 | 1074 | 0,1 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | RI, MS |
| 2 | Octane | 800 | 800 | 800 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | tr | 0,2 | 0,2 | 0,1 | RI, MS |
| 3 | E-2-Hexéanal | 832 | 832 | 1216 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | RI, MS |
| 4 | Z-3-Hexène-1-ol | 851 | 845 | 1341 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - | 0,1 | RI, MS, Ref1 |
| 5 | 1-Hexanol | 855 | 850 | 1340 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | RI, MS |

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1). ^bRI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005. ^cRI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique ; ^dPourcentages des composés. Station : (A1-A5), A1 : welhassa, A2: Témouchent1, A3: Zwanef, A4: Sidi bel Abbès, A5: Témouchent2; Réf1, Composés identifiés à partir des données de la littérature König et Coll., 2001; Réf2, Composés identifiés des données du NIST.

D'un point de vue qualitatif, les échantillons de l'ensemble des stations présentent une composition chimique homogène. Quantitativement, les composés majoritaires de *P. sordidum* varient comme suit: α -pinène (1,2% à 2,7%); sabinène (0,1% - 3,6%); β -pinène (20,1% - 25,7%); myrcène (4,4% - 7,3%); α -phéllandrène (0,8% - 2,8%); *p*-cymène (1,9% - 4%); limonène (7,1% - 12,1%); décanal (2,4% - 6,8%); thymol (1,8% - 11,0%); (E)- β -caryophyllène (10,6 % - 14,8%); germacrène-D (3,6% - 6,1%) et l'oxyde de caryophyllène (2% - 3,6%). On note que la variation la plus importante est celle du thymol. En récurrence, les composés majoritaires de *P. saxatile* varient faiblement : α -pinène (2,4% - 3,5%); β -pinène (33,5% - 40%); *p*-cymène (2,3% - 5%); limonène (2% - 3,9%); nonanal (5,2% - 9,5%); décanal (2,7% - 4,8%); undécanal (1% - 4,4%) et tridécanal (2,8% - 5,1%).

L'étude des profils des huiles essentielles *P. sordidum* révèle que la teneur en monoterpènes hydrocarbonés est légèrement supérieure dans les huiles essentielles dans la station de Misserghine. Cependant, les teneurs en monoterpènes oxygénés et oxygénés non terpénique sont élevées dans les stations de Ouchebe, Dzarifette et Ain fetouh. En revanche, les profils des huiles essentielles des stations de *P. saxatile* sont vraisemblablement homogènes.

Enfin, au vu de cette analyse, on constate que l'étude de la variabilité qualitative et quantitative des huiles essentielles révèle une très grande similitude entre les différentes stations.

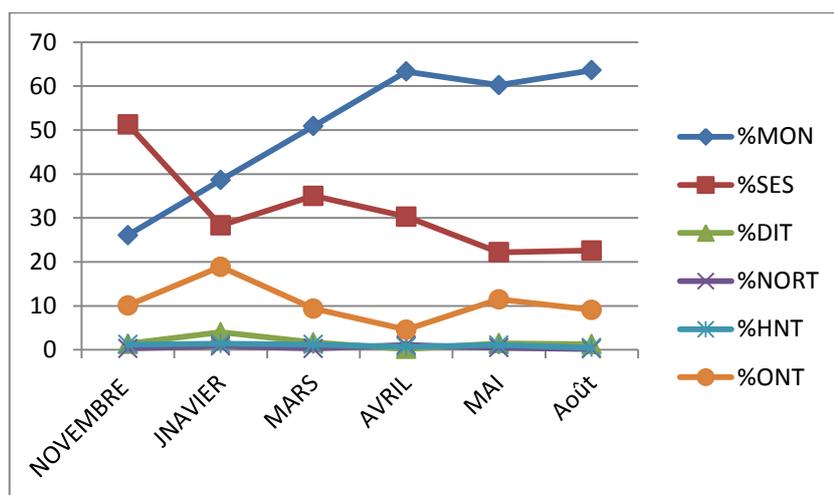
II.3. Composition chimique des H.E en fonction du cycle végétatif :

Au cours de cette étude, une évaluation de la variation de la composition chimique des huiles essentielles en fonction du cycle végétatif est réalisée. Les stations choisies sont la station de Mansourah (S6) pour *P. sordidum* L., et la station Emir Abdelkader (A6) pour *P. saxatile*. Un suivi rigoureux de la composition chimique des huiles essentielles en fonction de l'évolution végétative de la plante, du repos hivernale de la plante jusqu'à la fin de la floraison (avant, pendant et après la floraison) est effectué. Durant cette étude, pour chaque station, on a contrôlé ce paramètre en réalisant six prélèvements sur la même station (Tableaux 18 & 19).

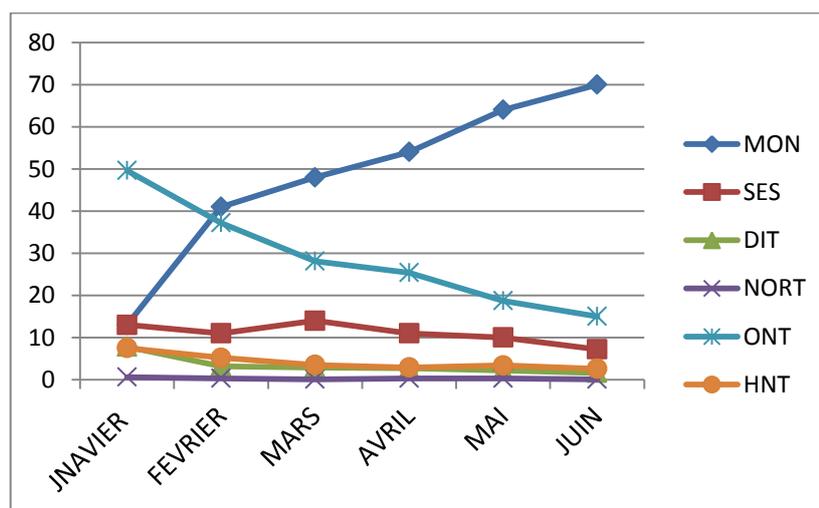
Tableau 18: Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. sordidum* L. en fonction de son stade de développement.

Tableau 19: Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle du *P. Saxatile* en fonction de son stade de développement.

MON : monoterpènes (hydrocarbonés + oxygénés) ; SES : sesquiterpènes (hydrocarbonés + oxygénés) ; DIT : diterpènes ; NOR : nor-terpénique ; HNT : hydrocarbonés non terpénique ; ONT : oxygénés non terpénique.
 Les résultats regroupés dans les Tableaux 18 & 19 ont permis de tracer les histogrammes 3 et 4 suivants :



Histogramme 3: Variation de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. sordidum* L. en fonction de son stade de développement.



Histogramme 4: Variation de la Composition chimique de l'huile essentielle de *P. saxatile* en fonction de son stade de développement.

La lecture des histogrammes prouvent que la composition chimique des huiles essentielles de deux *Phagnalons* varie considérablement en fonction de la période de la récolte de la plante. On constate des variations importantes des classes prédominantes, notamment, celles des monoterpènes, des sesquiterpènes et des oxygénés non terpénique. Il est à noter que vers la fin de la floraison, on observe une explosion quantitative des monoterpènes pour les deux *Phagnalons*.

L'analyse révèle aussi une diminution des pourcentages des sesquiterpènes des huiles essentielles de *P. sordidum* au cours de l'évolution du stade végétatif. D'un autre côté, contrairement à l'huile de *P. sordidum* L., on observe une diminution dans les pourcentages des oxygénés non terpénique dans l'huile de *P. saxatile*. Cependant, les sesquiterpènes varient faiblement.

Enfin, on observe que les teneurs en huile essentielle sont légèrement élevées après floraison et en période de floraison tandis qu'ils sont notablement plus faibles lorsque la plante est récoltée avant la floraison.

III- HUILE ESSENTIELLE DE *C. villosa* subsp. *intermedia*

III.1. Extraction des huiles essentielles :

Dans cette étude, l'espèce de *C. villosa* subsp. *intermedia*, a été récolté dans les stations de Mansourah (S1) et de Terny (S2) pendant le mois de mars 2011. Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger selon la technique conforme à la pharmacopée européenne (**Council of Europe, 1996**). Pour les deux stations, les rendements des huiles essentielles sont respectivement de 0,01 et de 0,02%.

III.2. Caractérisation des huiles essentielles :

L'analyse chromatographique (CPG-Ir & CPG/SM-IE) des huiles essentielles des deux stations S1 (Mansourah) et S2 (Terny) a permis d'identifier 50 composés, représentant 91,1 à 91,8% de la composition totale des huiles essentielles. Les résultats des analyses sont regroupés dans le Tableau 20 ci-dessous :

Tableau 20 : Composition chimique de l'H.E des parties aériennes de *C. villosa*.

| N° | Composés ^a | RI _a ^b | RI _a ^c | (S1) ^d | (S2) ^d | Identification ^c |
|----|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1 | <i>E</i> -2-Hexénal | 832 | 832 | tr | 0,5 | RI, MS Ref1 |
| 2 | <i>E</i> -2-Heptéнал | 927 | 924 | 0,6 | 0,1 | RI, MS, Ref2 |

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1).^bRI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de **König et Coll., 2001** et **NIST, 2005**.^cRI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique ; tr : trace (<0.05%) ; ^d % : pourcentages des composés. Stations: Mansourah (S1) & Terni (S2). Réf1, Composés identifiés à partir des données de la littérature **König et Coll., 2001**; Réf2, Composés identifiés des données du NIST.

L'huile essentielle de *C. villosa* est largement dominée par les composants non terpéniques (65,0% - 65,7%). Les acides (16,7% - 14%) constituent également une partie importante de la composition chimique des huiles. Par ailleurs, les sesquiterpènes hydrocarbonés (0,9%), les sesquiterpènes oxygénés (2,9% - 4,9%), les monoterpènes hydrocarbonés (0,6% - 1,4%) et oxygénés (2,1% - 2,3%) sont présents en faibles proportions.

On constate au vu de cette étude que les huiles essentielles de *C. villosa* sont caractérisées par la présence importante de molécules à structures linéaires [PT4].

IV. HUILE ESSENTIELLE DE *Iris planifolia*

IV.1. Extraction des huiles essentielles :

L'espèce d'*I. planifolia* a été collectée durant le mois de janvier 2011 dans la région de Mansourah (S). L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de l'*I. planifolia* a été réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Le rendement moyen en huile essentielle, déterminé par rapport à la matière sèche, est de l'ordre de 0,05%.

IV.2. Caractérisation des huiles essentielles :

Le profil chromatographique de l'huile essentielle de *I. Planifolia* montre l'existence de 47 composés dont 38 sont identifiés représentant 88,2% de la composition totale de l'huile essentielle (Tableau 21).

Tableau 21 : Composition chimique de l'H.E des parties aériennes d'*I. planifolia*.

| N° | Composés ^a | RI ^a ^b | RI ^a ^c | (S1) ^d | Identification ^e |
|----|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1 | Heptanal | 882 | 885 | 0.1 | RI, MS, Ref1 |
| 2 | Octanal | 981 | 973 | 0.3 | RI, MS, Ref1 |
| 3 | Limonène | 1025 | 1028 | 0.2 | RI, MS |
| 4 | Nonanal | 1076 | 1088 | 0.1 | RI, MS |
| 5 | Linalool | 1086 | 1089 | 0.8 | RI, MS |
| 6 | 1,4-Diméthoxybenzene | 1030 | 1130 | 0.5 | RI, MS, Ref2 |
| 7 | Dodécane | 1200 | 1200 | 0.5 | RI, MS |
| 8 | Eugénol | 1331 | 1331 | 0.1 | RI, MS |
| 9 | Tetradécane | 1400 | 1400 | 0.6 | RI, MS |
| 10 | Inconnu | - | 1432 | 2.7 | - |
| 11 | Tridecan-2-one | 1477 | 1470 | 2.9 | RI, MS |
| 12 | Tridecan-2-ol | 1490 | 1490 | 0.6 | RI, MS, Ref1 |
| 13 | Benzyltigate | 1498 | 1502 | 5.8 | RI, MS |
| 14 | Acide dodécanoïque | 1554 | 1557 | 0.6 | RI, MS, Ref2 |
| 15 | Inconnu | - | 1584 | 0.8 | - |
| 16 | Hexadécane | 1600 | 1600 | 0.2 | RI, MS |
| 17 | Inconnu | - | 1626 | 1.5 | - |
| 18 | Heptadécane | 1700 | 1700 | 0.2 | RI, MS |
| 19 | Benzyl benzoate | 1730 | 1727 | 0.4 | RI, MS, Ref2 |

| | | | | | |
|----|----------------------|------|------|------|--------------|
| 20 | Hexadecanal | 1795 | 1789 | 0.6 | RI, MS |
| 21 | Octadécane | 1800 | 1800 | 0.3 | RI, MS |
| 22 | Phytone | 1833 | 1828 | 8.1 | RI, MS |
| 23 | Hexadecanol | 1872 | 1869 | 1.4 | RI, MS |
| 24 | Heptadécane-2-one | 1892 | 1895 | 0.7 | RI, MS |
| 25 | Nonadécane | 1900 | 1900 | 0.3 | RI, MS |
| 26 | acide Hexadécanoïque | 1962 | 1953 | 18.5 | RI, MS, Ref2 |
| 27 | Inconnu | - | 1990 | 1.4 | - |
| 28 | Eicosane | 2000 | 2000 | 2.7 | RI, MS |
| 29 | Inconnu | - | 2009 | 1.1 | - |
| 30 | Octadécanal | 2017 | 2015 | 3.0 | RI, MS |
| 31 | Methylheptadécanol | 2030 | 2035 | 0.5 | RI, MS |
| 32 | Inconnu | - | 2052 | 1.5 | - |
| 33 | Inconnu | - | 2055 | 0.5 | - |
| 34 | Inconnu | - | 2062 | 1.7 | - |
| 35 | Inconnu | - | 2084 | 0.6 | - |
| 36 | Octadécanol | 2078 | 2075 | 2.6 | RI, MS |
| 37 | Heneicosane | 2100 | 2100 | 3.2 | RI, MS |
| 38 | (E)-Phytol | 2114 | 2107 | 2.9 | RI, MS |
| 39 | Docosane | 2200 | 2200 | 1.9 | RI, MS |
| 40 | Tricosane | 2300 | 2300 | 7.7 | RI, MS |
| 41 | Tetracosane | 2400 | 2400 | 0.8 | RI, MS |
| 42 | Pentacosane | 2500 | 2500 | 16.7 | RI, MS |
| 43 | Hexacosane | 2600 | 2600 | 0.2 | RI, MS |
| 44 | Heptacosane | 2700 | 2700 | 1.1 | RI, MS |
| 45 | Octacosane | 2800 | 2800 | 0.1 | RI, MS |
| 46 | Eicosanol | 2273 | 2272 | 0.2 | RI, MS, Ref2 |
| 47 | Heneicosanol | 2365 | 2372 | 0.8 | RI, MS, Ref2 |

| | |
|--------------------|--------------|
| % d'identification | 100.0 |
| Aldéhydes | 4,1 |
| Acides | 19,1 |
| Alcools | 9,0 |
| Cétones | 11,7 |
| Alcanes | 36,5 |
| Arylpropanoïdes | 6,8 |
| Monoterpènes | 1,0 |
| Inconnus | 11,8 |

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1).^bRI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de **König et Coll., 2001 et NIST, 2005**.^cRI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique ; tr : trace (<0.05%) ; ^d % : pourcentages des composés. Stations: Mansourah (S1). Réf1, Composés identifiés à partir des données de la littérature **König et Coll., 2001**; Ref2, Composés identifiés des données du NIST.

Selon les données de la littérature, les huiles essentielles des *Iris* d'Algérie n'ont fait l'objet d'aucune étude à ce jour, ce qui a motivé la caractérisation chimique des composants volatils. L'autre intérêt réside dans le fait que ces espèces sont très appréciés dans les préparations cosmétiques. Cette étude a permis de déceler une forte présence de composés non-terpénique. L'huile se compose principalement des alcanes (36,5%), des acides (19,1%), des cétones (11,7%), des alcools (9,0%), des arylpropanoïdes (6,8%), et des aldéhydes (4,1%), accompagnés de quantités relativement plus faibles en monoterpènes (1,0%) [PT1].

IV. HUILE ESSENTIELLES DE L'A. *halimus*

IV.1. Extraction des huiles essentielles :

Les extractions des huiles essentielles de la partie aérienne (feuilles, tiges et fleurs) de *A. halimus*, récoltée en avril 2011 dans la région de Beni Ounif sise dans la wilaya de Béchar, sont réalisées par la technique d'hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger. Le rendement moyen obtenu est de l'ordre de 0,02% par rapport à la masse de la matière sèche.

VI.2. Caractérisation des huiles essentielles :

Dans cette partie, on s'est intéressé à la détermination du profil chimique de l'huile essentielle de l'*A. halimus*. Pour ce faire, on a utilisé les mêmes techniques chromatographiques déjà décrites dans le chapitre II. Les résultats des analyses sont regroupés dans le Tableau 22 ci-dessous :

Tableau 22 : Composition chimique de l'H.E des parties aériennes (feuilles et tiges) de l'*A. halimus*.

| N° | Composés ^a | RI _a ^b | RI _a ^c | (S) ^d | Identification ^e |
|----|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|-----------------------------|
| 1 | Heptanal | 882 | 875 | 0,1 | RI, MS |
| 2 | Benzaldéhyde | 941 | 937 | 0,3 | RI, MS |
| 3 | Octen-3-one | 964 | 959 | 0,1 | RI, MS |

^aOrdre d'élution est donné sur colonne apolaire (Rtx-1).^b RI_{Lit} : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de **König et Coll., 2001 et NIST, 2005**.^c RI_a : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1. RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique ; ^d Pourcentages des composés. S : Station de Beni Ounif. Réf1, Composés identifiés à partir des données de la littérature **König et Coll., 2001**; Ref2, Composés identifiés des données du NIST.

La recherche bibliographique révèle qu'aucune étude n'a été publiée, à ce jour, portant sur l'identification chimique de l'huile essentielle de l'*A. halimus*. Nos investigations révèlent que l'huile essentielle de la partie aérienne (feuilles et tiges) est constituée de 155 composés dont

99 sont identifiés, représentant 85,1% de la composition totale de huile essentielle. Les principaux composés sont (Tableau 22) : E-anéthol (13,9%), phytone (9,5%), carvone (6,0%), carvacrol (4,2%), et acétone de géranyl (3,0%).

Cette huile essentielle est proportionnellement composée de : monoterpènes oxygénés (20,9%), arylpropanoïdes (14,8%), oxygénés non terpénique (13,2%), diterpènes (12,2%), hydrocarbonés non terpénique (11,6%), sesquiterpènes hydrocarbonés (4,9%), sesquiterpènes oxygénés (3,1%), et monoterpènes hydrocarbonés (0,5%).

Les monoterpènes oxygénés les plus importants sont : carvone (6%), carvacrol (4,2%) et l'acétone de géranyl (3,0%). D'autre part, les monoterpènes hydrocarbonés sont présents en quantité assez faible, environ (0,5%). Par ailleurs, Ar-tumerone (1,1%) et E-(B)-caryophyllène (0,7%) sont les composés prédominant des sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés.

Pour les autres classes, les constituants présents en forte teneur sont :

- ❖ Aryl propanoïdes (14,8%) : E-anéthol (13,9%)
- ❖ Oxygénés non terpénique : undecan-2-one (2,7%)
- ❖ Diterpènes : phytone (9,5%)
- ❖ Hydrocarbonés non terpénique : nonadecène (2,2%)

Le genre *Atriplex*, en Algérie, est représenté par 13 espèces (**Quèzel et Santa, 1963**). Malheureusement, à l'heure actuelle, peu d'études ont mentionné la composition de l'huile essentielle des *Atriplex*. A notre connaissance, deux publications font état de la composition chimique de l'huile essentielle de feuilles du genre d'*Atriplex*. Notamment les travaux de **Rodriguez et Murray (2010)** sur la composition chimique de l'huile essentielle de l'*A. undulata*. Cette dernière contient une essence renfermant en majorité : *p*-acétanisole (28,1%), β -damascénone (9,3%), β -ionone (5,1%), viridiflorène (4,7%) et 3-oxo- α -ionol (2,2%).

Plus récemment, **Jenis, et Coll. (2010)** ont étudiés l'huile essentielle de la plante entière de l'*A. tatarica*. Les principaux constituants sont : 1-méthoxy-4-(1-propényl) benzène (45,84%), heptacosane (9,82%), 1H-indole-5-ol (6,81%) et 2-méthyl propyl ester (4,03%).

Ces résultats montrent bien des différences importantes des profils chimiques des huiles essentielles des espèces citées dans la littérature et de l'espèce d'*A. halimus*, objet de cette

étude. Ces différences sont peut être dues aux facteurs relatifs à l'écosystème (climat, nature du sol, pluviométrie, etc.)

**Chapitre VI : EVALUATION DE L'ACTIVITE
ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES
HUILES ESSENTIELLES**

Sommaire

I- INTRODUCTION

II- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

III- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE

I- INTRODUCTION

Ces dix dernières années, des recherches intensives ont été menées sur les effets antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles. Ces derniers constituent une source potentielle des biomolécules. Dans une perspective de valorisation de nos huiles essentielles, on s'est intéressé à étudier leurs effets antimicrobien et antioxydant.

II- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire Antibiotiques, Antifongique: Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique (LAPSAB), Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen, on a évalué les activités antibactériennes des huiles essentielles étudiées vis-à-vis de onze souches bactériennes de référence. Il s'agit de : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Le choix de ces dernières est basé sur leur pouvoir de pathogénicité. Ces souches bactériennes sont des lots de « *American Type Culture Collection* » : ATCC.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles, évaluées par la méthode de contact direct en milieu liquide, sont consignés dans le Tableau 23. La Gentamycine est utilisée comme antibiotique de contrôle.

Tableau 23: Activités antibactériennes des huiles essentielles.

| Souches | Méthode de Dilution CMI (mg/ml) |
|---|------------------------------------|
| <i>P. sordidum</i> L. | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 104,156 |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | 52,08 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 6,51 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659 | 26,04 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | 26,04 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876 | 52,08 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 | 104,156 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 | 0,04 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063 | 0,04 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0,01 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 | 3,25 |

| <i>P. saxatile</i> | |
|--|---------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 114,58 |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | 57,29 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 28,64 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659 | 57,29 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | 28,64 |
| <i>Bacillus cerius</i> ATCC 10876 | 28,64 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 | 229,16 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 | 57,08 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063 | 104,156 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 52,08 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 | 57,08 |
| <i>A. halimus</i> | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 5,2 |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | 10,41 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 2,6 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659 | 10,41 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | 5,2 |
| <i>Bacillus cerius</i> ATCC 10876 | 5,2 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 | 10,41 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 | 5,2 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 | 10,41 |
| <i>I. planifolia</i> | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 6,25 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 | 25 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063 | 3,12 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 | 3,12 |
| <i>C. villosa subsp. intermedia</i> | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0,03 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 | 0,06 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063 | 0,12 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 | 0,12 |
| Gentamycine | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | 0,39 |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090 | 0,19 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 0,78 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659 | 0,19 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 | 0,78 |
| <i>Bacillus cerius</i> ATCC 10876 | 0,19 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313 | 3,12 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 | 0,78 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70063 | 3,12 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0,19 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452 | 3,12 |

Le Tableau 23 résume l'évaluation de la sensibilité des bactéries choisies vis-à-vis des huiles essentielles de *P. sordidum*, *P. saxatile*, *A. halimus*, *I. planifolia* et *C. villosa* subsp. *intermedia*, provenant des stations de Mansourah, Emir Abdelkader, Beni Ounif, Mansourah.

Cette étude a trait à l'évaluation de l'activité des huiles essentielles de *P. sordidum*, *A. halimus*, *I. planifolia*, de *C. villosa* subsp. *intermedia*. Il est à noter qu'elle est décrite pour la première fois. En effet, une recherche minutieuse dans la bibliographie ne fait mention d'aucune étude sur l'activité antibactérienne de ces plantes.

Les résultats montrent que les souches bactériennes testées sont très sensibles aux huiles essentielles de *P. sordidum* et de *C. villosa* subsp. *intermedia* [PT4], notamment vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 4945, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311.

En revanche, l'huile essentielle *P. saxatile* n'a pas révélé le même pouvoir antibactérien contre l'ensemble des souches testées. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, particulièrement avec les travaux de (Senatore et Coll., 2005).

Par ailleurs, l'huile essentielle de l'*I. planifolia* s'avère moyennement efficace contre toutes les souches testées. La bactérie la plus sensible à son action est *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 avec une concentration minimale inhibitrice de 3,12 mg/ml [PT1]. Enfin, l'huile essentielle de l'*A. halimus* inhibe faiblement les souches testées. Notons que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est la souche la plus vulnérable, avec une concentration minimale inhibitrice de 2,6 mg/ml.

Il est à noter que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est due, principalement, à sa composition chimique, et en particulier, à la nature de ses composés majoritaires (Lawrence, 1993 ; Dorman et Deans, 2000). Elle peut être attribuée, aussi, à une ou plusieurs molécules, présente(s) en faible(s) proportion(s) dans les huiles essentielles (Belaiche et Coll., 1995; Tzakou et Coll., 2007).

De nombreux travaux ont démontré la corrélation entre l'activité antibactérienne et le profil chimique d'une huile essentielle. Ses travaux classent l'activité exercée par les composés majoritaires des huiles essentielles dans l'ordre suivant : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures. Par ailleurs, ses mêmes études ont signalé des effets de synergie entre l'ensemble des constituants chimiques (Kalemba et Kunicka, 2003).

III- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE

Actuellement une grande diversité des méthodes analytiques est disponible pour la détermination de la capacité antioxydante. Dans notre étude, l'activité antioxydante des huiles essentielles est évaluée par deux méthodes : le test de la réduction du radical libre du DPPH et le test de réduction du fer (FRAP).

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *P. sordidum*, *P. saxatile*, *A. halimus*, *I. planifolia* et *C. villosa* subsp. *intermedia*, provenant des stations de Mansourah, Emir Abdelkader et Beni Ounif est évaluée par la mesure des absorbances à différentes concentrations. La comparaison et la validation des résultats sont effectués avec un contrôle positif utilisant l'acide ascorbique. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le Tableau 24.

Tableau 24: Test de réduction du radical DPPH° par les huiles essentielles.

| Échantillons (mg/ml) | Pourcentage de réduction de DPPH (%) | IC ₅₀ ^a (mg/ml) |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Huile essentielle de <i>P. sordidum</i> | | |
| 0,1 | 8,23 | |
| 0,2 | 9,25 | |
| 0,6 | 36,74 | 0,78 |
| 0,8 | 54,41 | |
| 1 | 62,18 | |
| Huile essentielle de <i>P. saxatile</i> | | |
| 0,2 | 9,55 | |
| 1,2 | 15,07 | |
| 1,8 | 18,6 | 28,20 |
| 10,8 | 30,01 | |
| 32,4 | 54,47 | |
| Huile essentielle de l'A. <i>halimus</i> | | |
| 0,2 | 9,3 | |
| 0,5 | 13,71 | |
| 1 | 26,72 | 2,66 |
| 1,5 | 40,2 | |
| 3 | 51,12 | |

Huile essentielle de *I. planifolia*

| | | |
|------|-------|-------------|
| 0,04 | 6,81 | |
| 0,05 | 7,34 | 0,20 |
| 0,06 | 8,91 | |
| 0,08 | 10,78 | |
| 0,2 | 50,03 | |

Huile essentielle d'*C. villosa* subsp. *intermedia*

| | | |
|-----|----|-------------|
| 0,1 | 6 | |
| 0,4 | 13 | 1,25 |
| 0,8 | 42 | |
| 1,6 | 60 | |

Concentration-Acide ascorbique (mg/ml)

| | | |
|------|-------|--------------|
| 0,04 | 39,40 | |
| 0,05 | 51,03 | |
| 0,06 | 68,57 | 0,048 |
| 0,08 | 97,84 | |
| 0,2 | 98,36 | |

^aIC₅₀: Concentration qui fournit 50% d'inhibition du DPPH^b

A la lumière de la lecture des résultats mentionnés dans le Tableau 24, on en déduit que l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *I. planifolia* est la plus intéressante. L'ordre de la tendance des huiles essentielles de réduire les radicaux libres du DPPH est le suivant : *I. planifolia* (IC₅₀= 0,2 mg/ml) > *P. sordidum* (IC₅₀=0,78 mg/ml) > *C. villosa* subsp. *intermedia* (IC₅₀= 1,25 mg/ml) > *A. halimus* (IC₅₀= 2,66 mg/ml) > *P. saxatile* (IC₅₀= 28,20 mg/ml).

Les résultats du test de réduction du fer (FRAP) par les huiles des cinq plantes étudiées sont regroupés dans le Tableau 25 ci-dessous :

Tableau 25: Test de réduction du Fer par les différentes huiles essentielles.

| Concentration (mg/ml) | 1,5 | 1 | 0,75 | 0,50 |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| A (<i>P. sordidum</i>) | 0,231 | 0,208 | 0,055 | 0,015 |
| A (<i>P. saxatile</i>) | 0,054 | 0,031 | 0,028 | 0,007 |
| A (<i>A. halimus</i>) | 0,097 | 0,053 | 0,039 | 0,014 |
| A (<i>I. planifolia</i>) | 0,249 | 0,216 | 0,072 | 0,035 |
| A (<i>C. villosa</i>) | 0,103 | 0,084 | 0,043 | 0,021 |
| A (Acide Ascorbique) | 0,633 | 0,533 | 0,481 | 0,246 |

A : Absorbance de l'huile essentielle.

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP confirment le potentiel antioxydant important des huiles essentielles de *I. planifolia*, *P. sordidum* L., et *C. villosa* subsp. *intermedia*. En effet, les tests montrent que les huiles de *I. planifolia* et de *P. sordidum* L. possèdent une bonne affinité avec les ions Fe^{3+} . Cette capacité de réduction des radicaux libres par les huiles essentielles de *I. planifolia* et *P. sordidum* est due, principalement, à leur profil chimique riche en composés phénoliques tels que le thymol et le benzyltiglate. Ces composés, grâce à leurs propriétés d'oxydo-réduction, agissent en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et d'oxygène singulier (Tepe, 2005 ; Tepe et Coll., 2007 ; Rice-Evans et Coll., 1995)

Cependant, il est prouvé que les activités antioxydantes des composés majoritaires, testés séparément, donnent, souvent, des résultats inférieurs comparés à l'activité de la totalité de l'huile essentielle (Safaei-Ghomi, 2009). En général, la synergie des différents constituants d'une huile essentielle est à l'origine du pouvoir antioxydant. En outre, certains constituants des huiles essentielles tels que les hydrocarbonés possèdent aussi une forte activité antioxydante (Vardar-Ünlü, 2003).

En conclusion, les activités antimicrobienne et antioxydante observées sont dues, principalement, à la composition chimique de ces huiles. L'ensemble de ses résultats laisse entrevoir des perspectives de la recherche de formulation à base des huiles essentielles étudiées à la place de certains conservateurs ou antioxydants de synthèse dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

***Chapitre VI : EVALUATION DE L'ACTIVITE
ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES
HUILES ESSENTIELLES***

Sommaire

I-INTRODUCTION

II-CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'*A.halimus*

III-DOSAGE DES POLYPHENOLS

IV- ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'*A. halimus*

IV.1. Résultats

IV.1.1. Toxicité aigüe de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*

IV.1.2. Induction du diabète par la Streptozotocine

IV.1.3. Evolution du poids des rats

IV.1.4. Evolution de la glycémie à jeun

IV.1.5. Test de tolérance orale au glucose

IV.1.6. Test à court terme

IV.2. Discussion

I- INTRODUCTION

La recherche et l'identification de produits actifs à partir des plantes ont toujours présentés un grand intérêt en pharmacologie. Ces recherches passent essentiellement par un criblage phytochimique qui constitue une étape indispensable dans la démarche d'étude des plantes médicinales et aromatiques. Dans cette partie, on s'est intéressé, en particulier, à étudier la phytochimie et l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*, une plante utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour le traitement du diabète [PT5].

II- CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'*A. halimus*

L'idée consiste à réaliser un criblage des principales familles chimiques présentes dans la plante. Cette étape préliminaire servira dans le processus d'étude biologique. En effet, elle constitue une base de données sur les principaux métabolites existants dans l'extrait. De plus, elle permet d'orienter l'interprétation des résultats.

Les résultats du screening phytochimique effectué sur l'extrait aqueux de l'*A. halimus* sont regroupés dans le Tableau 26.

Tableau 26: Criblage phytochimique de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*.

| Famille chimique | Extrait aqueux |
|------------------|----------------|
| Coumarines | - |
| Tanins | + |
| Saponosides | + |
| Alcaloïdes | + |
| Flavonoïdes | + |
| Triterpénoïdes | + |

- : absence, + : présence

Le criblage phytochimique révèle la présence des terpénoïdes, saponines, alcaloïdes, flavonoïdes et tannins. Ces métabolites secondaires ont un large panel d'activité biologique, et sont probablement à l'origine des vertus médicinales de l'*A. halimus*.

III- DOSAGE DES POLYPHENOLS

Les méthodes de dosage, décrites dans la littérature, sont, généralement, basées sur l'oxydation des composés phénoliques totaux et le développement d'une coloration. La plus utilisée est celle de **Folin-Ciocalteu**. Pour ce dosage, on a utilisé l'acide gallique à différentes concentrations pour tracer la courbe d'étalonnage (Figure 49). Le résultat du dosage des polyphénols est mentionné dans le Tableau 26.

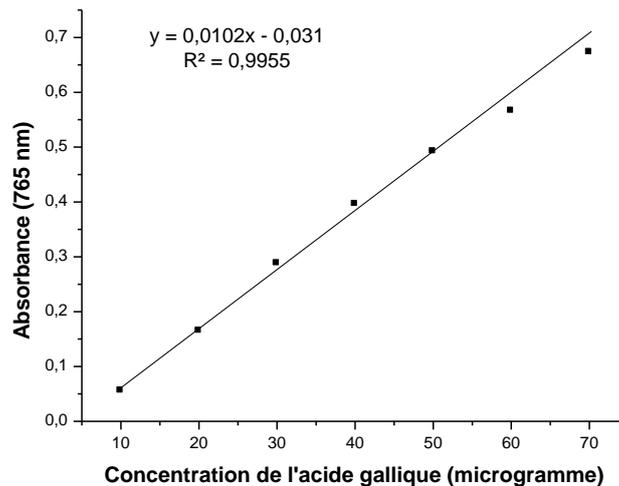


Fig.49: Courbe d'étalonnage des phénols totaux.

Tableau 26: Résultat du dosage des polyphénols totaux de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*.

| Extrait | Polyphénols totaux ^(a) |
|----------------|-----------------------------------|
| Extrait aqueux | 12,47 |

(a) μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait).

L'extraction est une étape préliminaire très importante avant l'analyse quantitative et qualitative des polyphénols, particulièrement, ce dosage dépend fortement des procédés d'extractions utilisés. Plusieurs facteurs influent sur la teneur en composés phénoliques. A titre d'exemple, on cite la méthode de purification, la nature du solvant, la température et le pH du milieu d'extraction.

Ces dernières années, les polyphénols ont fait l'objet de nombreux travaux, soulignant leurs multiples effets biologiques, notamment antioxydant, antidiabétique, etc. (**Iwai, 2008**).

Cette étude révèle que l'extrait aqueux contient une teneur de polyphénols totaux d'environ 12,47 μg EAG/mg.

IV- ACTIVITE ANTIDIABETIQUE DE L'EXTRAIT AQUEUX DE L'A. *halimus*

IV.1. Résultats :

IV.1.1. Toxicité aigüe de l'extrait de l'A. *halimus* :

Après l'administration de 3g/kg de l'extrait aqueux de l'A. *halimus* par voie orale, les rats sont suivis pendant deux semaines. Cette dose n'a provoqué aucun décès chez les rats, avec une consommation normale des aliments et une évolution améliorée du poids corporel. Il est à noter qu'aucune létalité ni de réactions toxiques ne sont observées en utilisant la dose sélectionnée, et ce pendant toute la période d'étude.

IV.1.2. Induction du diabète par la Streptozotocine (STZ) :

Une semaine après l'injection de 50 mg/kg de la STZ aux rats, les signes suivants sont notés : polyurie, polydipsie et polyphagie. L'analyse de la glycémie montre que la STZ a provoqué un état d'hyperglycémie située entre 2,80 et 4,65 g/l.

IV.1.3. Evolution du poids des rats :

L'évolution du poids des rats constitue un paramètre très important. Les données du suivi régulier des animaux sont regroupées ci-dessous (Figure 50) :

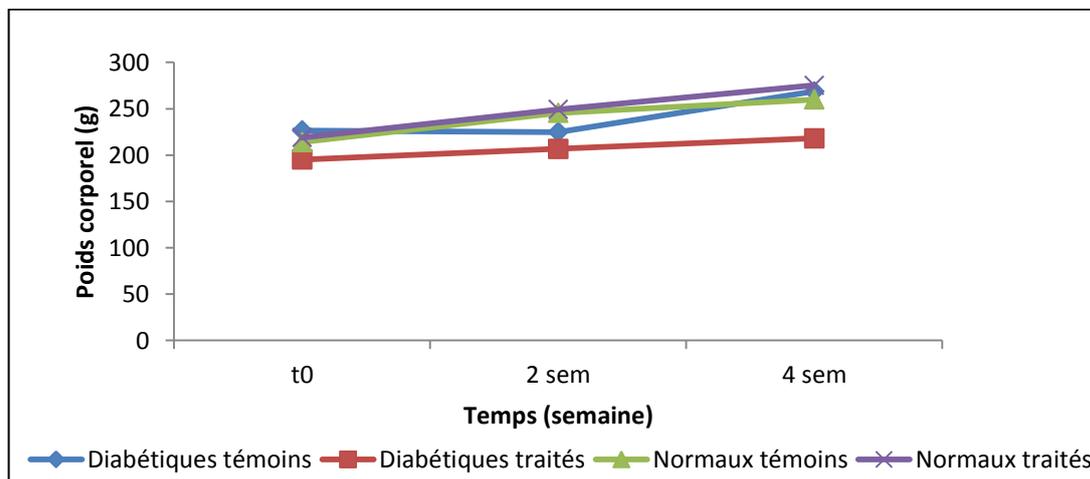


Fig. 50 : Évolution du poids des rats normaux et diabétiques témoins et traités durant les quatre semaines de traitement.

Beaucoup de travaux font référence au fait qu'il y a une différence entre la croissance des rats normaux et celle des rats diabétiques. Ces derniers subissent, au vu de leur état, une diminution de leurs poids corporels.

Le suivi des rats diabétiques traités avec l'extrait aqueux révèle, qu'à partir de la 2^{ème} semaine du traitement, une augmentation modérée des poids des rats est observée.

IV.1.4. Evolution de la glycémie à jeun :

Les données traduites sur la Figure 51 montrent l'influence de l'extrait aqueux de l'*A. halimus* sur la glycémie. Dès les premières semaines du traitement par 200 mg/kg de l'extrait aqueux de l'*A. halimus*, une diminution significative de la glycémie chez les rats diabétiques traités est remarquée. Chez les rats normaux, par contre, la glycémie reste normale.

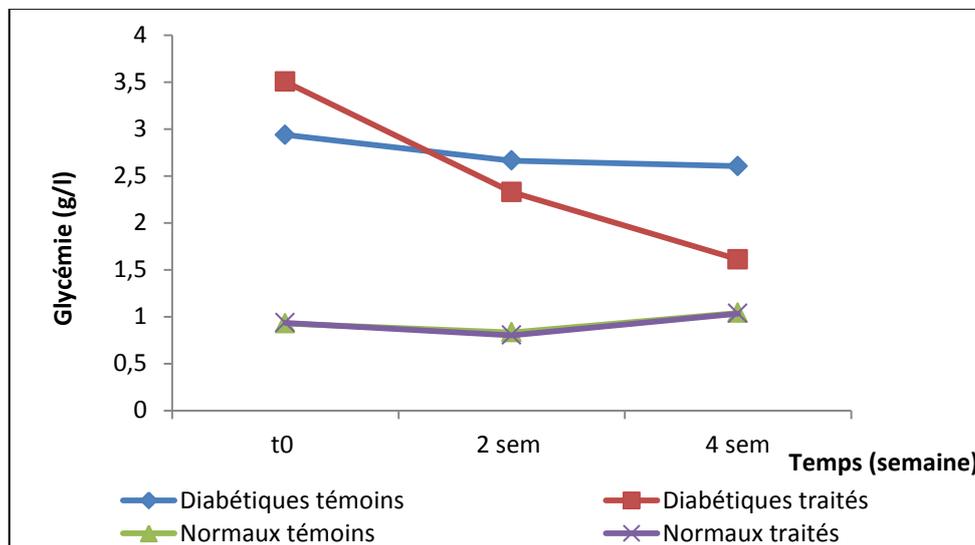


Fig. 51: Évolution de la glycémie chez les rats normaux et diabétiques témoins et traités durant les quatre semaines de traitement.

IV.1.5. Test de tolérance orale au glucose :

Ce test est basé sur le suivi de la glycémie après gavage avec 3 g/kg de glucose. Il a permis d'obtenir les résultats traduits sur la Figure 52. Une heure après le gavage avec du glucose, on a remarqué une augmentation de la glycémie chez tous les rats diabétiques et normaux. Cette élévation est très remarquable chez les rats diabétiques traités. La perturbation de la glycémie causée par le glucose est rapidement régulée chez les rats normaux.

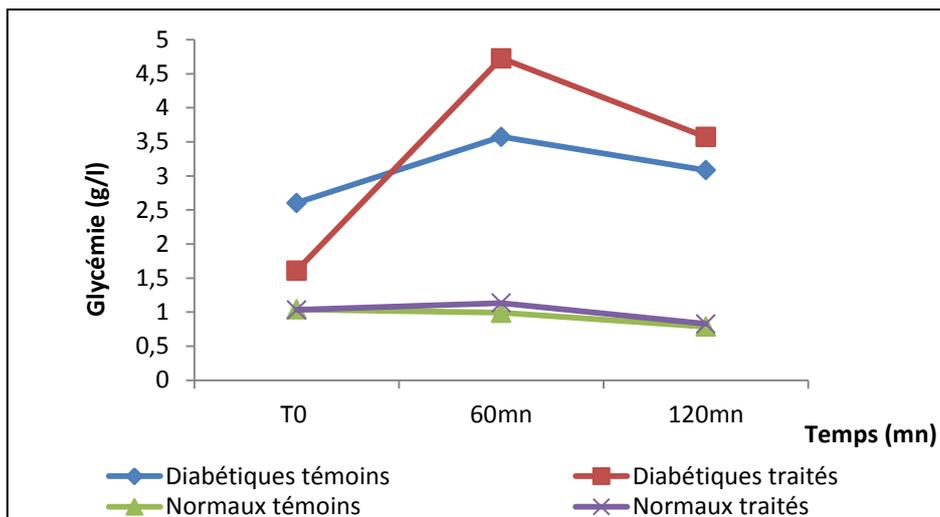


Fig. 52: Test de la tolérance orale des rats au glucose.

IV.1.6. Test à court terme :

La figure 53 montre l'effet de 200mg/kg de l'extrait aqueux de l'*A. halimus* sur la glycémie à jeun des rats pendant 3 heures. On a constaté une diminution significative de la glycémie chez les rats diabétiques jusqu'à la troisième heure. Par contre, la variation de la glycémie des rats normaux est dans les limites normales.

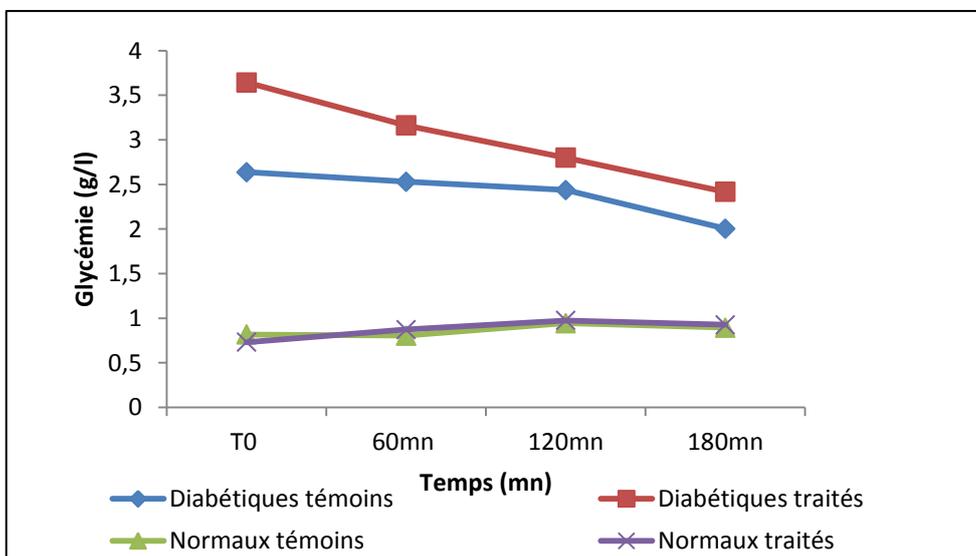


Fig. 53: Effet de l'extrait sur la glycémie à jeun pendant trois heures.

IV.2. Discussion :

Le diabète sucré touche aujourd'hui 366 millions de personnes dans le monde. Selon les projections de l'OMS, le nombre de décès par le diabète va doubler entre 2005 et 2030. Sans traitement approprié, cette pathologie entraîne de nombreuses complications et séquelles irréversibles comme les maladies cardiaques, la cécité, l'impuissance, les amputations, etc. (Fagherazzi, 2011).

Pendant ces dernières décennies, une attention particulière a ciblé l'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète sucré suivant les recommandations de l'OMS (OMS, 2002). Actuellement, plus de 1123 plantes sont utilisées en pharmacopée traditionnelle pour lutter contre le diabète sucré (Marles et Farnsworth, 1994). Cependant, juste une minorité d'entre elles ont été scientifiquement étudiées. On cite, essentiellement, *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus*, *Trigonella foenum-greacum*, *Allium cepa* et *Allium sativum* (Al-achi, 2005).

L'*A. halimus* est une plante utilisée par l'homme et l'animal. Les populations des Touaregs mangent ses feuilles après cuisson ou crues et utilisent leurs cendres comme savon. Les tisanes préparées, à base de cette plante, sont très efficaces contre une acidité élevée dans l'estomac. De plus, les racines sont bénéfiques pour la gencive. Cette plante est, surtout, utilisée contre les tumeurs (Halimi, 2004).

La distribution du *Psammomys besus* (rat des sables) est limitée aux zones où se développent les plantes halophiles de la famille des chénopodiacées telle que l'*A. halimus*. Dans son milieu naturel, cet animal se nourrit de plantes salées pauvres en calories, alors que soumis à un régime standard de laboratoire, 40% des rats deviennent obèses et développent un diabète sucré de type 2 avec des taux élevés d'insuline plasmatique. Ce diabète disparaît lorsque l'animal est replacé dans son milieu naturel (Cerasi et Coll., 1997). Plusieurs hypothèses ont été suggérées, basées essentiellement sur l'idée que les rats des sables sont prédisposés au diabète et que la maladie survient dès qu'ils sont soumis à un régime riche en calories (Yokio, 2001).

L'objectif de cette étude est de rechercher l'efficacité de l'*A. halimus* sur le diabète induit chez le rat Wistar. Les résultats montrent que l'administration de l'extrait aqueux de l'*A. halimus* à une dose de 200 mg/kg provoque une diminution hautement significative de la glycémie après quatre semaines de traitement.

La littérature révèle que les travaux réalisés sur l'effet antidiabétique de l'*A. halimus* sont limités à ceux de:

- **Aharonson et Coll. (1969)** ont montré que l'extrait aqueux ainsi que le jus pressé des feuilles provoquent un effet antihyperglycémiant chez des rats normaux et diabétiques.
- **Mertz et Coll. (1973)** ont montré que les cendres de l'*A. halimus* potentialisent l'effet de l'insuline.

Les plantes médicinales contiennent des éléments inorganiques. Ces éléments possèdent des propriétés médicinales très diversifiées. En effet, **Bhaskar et Coll. (2008)** ont étudié l'effet hypoglycémiant des extraits aqueux des plantes « 200 mg/kg » sur des rats rendus diabétiques par STZ. Les résultats indiquent que certains minéraux tels que Na, K, Ca, Zn, Mg, Fe, Cu et Mn peuvent être associés à un mécanisme de libération de l'insuline et de son activité.

De plus, plus de 150 extraits de plantes et de certains de leurs métabolites secondaires sont connus pour être utilisés dans le traitement du diabète (**Iwai, 2008**).

En observant attentivement les résultats obtenus, on en conclue que l'extrait aqueux ne régule pas l'hyperglycémie provoquée par voie orale. Cette diminution du taux du glucose est observée dans le cas d'une hyperglycémie à jeun résultant d'une production hépatique de glucose par deux phénomènes importants, notamment, la néoglucogenèse et la glycogénolyse (**Wright et Coll., 1980**). Il est donc possible que dans ce cas l'extrait aqueux de l'*A. halimus* inhibe ces deux systèmes biochimiques aboutissant à la diminution de l'hyperglycémie à jeun. Cependant, cette explication suggérée demande à être confirmée par tests biologiques plus poussés, d'autant plus, qu'actuellement, les molécules diminuant la vitesse de la libération hépatique du glucose, par des mécanismes moléculaires variables, sont très recherchées (**Wagner, 2002**).

Il ressort des résultats ci-dessus que l'extrait aqueux de l'*A. halimus* est doté d'une activité antihyperglycémiant remarquable. Cette étude reste préliminaire et nécessite d'être poursuivie par d'autres travaux afin de comprendre le mécanisme par lequel agissent les molécules actives ainsi, une étude phytochimique plus poussée est essentielle.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'Algérie par sa position géographique abrite une biodiversité exceptionnelle occupée par une importante richesse des Plantes Aromatiques et Médicinales « PAM ». Nombreux PAM sont utilisées dans les remèdes traditionnels et qui ne sont pas évaluées scientifiquement. L'objectif de ce travail est de valoriser cette richesse, particulièrement, de la région Ouest de l'Algérie.

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation de cinq plantes médicinales de l'ouest d'Algérie, en utilisant des outils chimiques aiguisés pour établir les profils chimique des mélanges complexes des huiles essentielles étudiées. Après avoir caractérisé les huiles essentielles, nos efforts ont porté, ensuite, sur leur valorisation par le biais de la réalisation des tests biologiques.

La composition chimique, des huiles essentielles extraites des parties aériennes de *P. sordidum* L., *P. saxatile*, *A. halimus*, *I. planifolia*, et *C. villosa* subsp. *intermedia* provenant de différentes stations de l'ouest d'Algérie, a fait l'objet d'une étude détaillée par une analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG, Ir et CPG/SM-IE).

Dans cette partie, l'ensemble des résultats obtenus montrent que les huiles essentielles du genre *Phagnalons* se rapprochent par une forte abondance en monoterpène hydrocarbonés et se distinguent entre eux dans les portions des composés oxygénés non terpénique. L'établissement des profils chimiques par CPG, Ir et CPG- SM-IE des huiles essentielles de ce genre révèle que l'huile collective de *P. sordidum* L. est riche en monoterpènes hydrocarbonés (51%) et sesquiterpènes hydrocarbonés (18,2%). En revanche, l'huile collective de *P. saxatile* est riche en monoterpènes hydrocarbonés (43,5%) et en oxygénés non terpénique (25,8 %).

L'étude de la variabilité interspécifique et intraspécifique de *Phagnalons* réalisée sur les dix stations réparties dans l'ouest d'Algérie, montre que les profils des huiles essentielles présentent une très grande homogénéité. En revanche, les résultats des analyses des huiles essentielles en fonction de l'évolution végétative de la plante révèlent que la composition chimique des huiles essentielles des deux *Phagnalons* varie, considérablement, par rapport à la période de la récolte.

D'autres plantes sont étudiées dans cette thèse, notamment *C. villosa* subsp. *intermedia* et *I. planifolia* dont les huiles essentielles sont décrites pour la première fois. Elles sont dépourvues de terpènes et sont caractérisées, particulièrement, par la présence de molécules à structures linéaires.

L'huile essentielle de l'*A. halimus* est, également, étudiée pour la première fois. Elle renferme en majorité des monoterpènes oxygénés (20,9%), des arylpropanoïdes (14,8%), des oxygénés non terpénique (13,2%), des diterpènes (12,2%) et des hydrocarbonés non terpénique (11,6%).

Dans la seconde partie de cette étude, une évaluation des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles obtenues est réalisée. L'activité antibactérienne des huiles essentielles est menée sur des souches de références pathogènes. Les résultats montrent que les huiles essentielles de *P. sordidum*, *C. villosa* subsp. *intermedia*, *I. planifolia*, sont actives contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 4945, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. D'autre part, l'activité antioxydante des huiles est, également, testée avec deux méthodes, à savoir la réduction relative du radical (DPPH) et le test de réduction de fer (FRAP). Les tests montrent un pouvoir antioxydant intéressant des huiles essentielles de *I. planifolia* et de *P. sordidum*.

Enfin, la dernière partie de nos investigations a trait à l'évaluation de l'activité antidiabétique de l'extrait aqueux brut de l'*A. halimus*. Les résultats préliminaires montrent une efficacité de la plante étudiée dans le cas du diabète sucré. En effet, les tests révèlent que l'extrait aqueux brut, des feuilles de l'*A. halimus*, possède un effet antihyperglycémiant chez les rats Wistar rendus diabétique par la streptozotocine.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abbade A.**, El Hadrami A., El Hadrami I., Benchaabane A., Seasonal chemical composition of leaves of three *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae) natural populations grown in a common garden. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol. 7, Issue: 2, **2004**, pp.203-208.
- Aboura R.**, Mémoire de magister : comparaison phytoécologique des *atriplexaies* situées au nord et au sud de Tlemcen. Université Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen, **2006**, pp.69.
- Adams R.P.**, Identification of essential oil components by gaz chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured Publishing. Carol Stream, IL, USA, **2001**.
- Aharonson Z.**, Shani (Mishkinsky) J., Sulman F.G., Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a feeding source of the Sand Rat (*Psammomysobesus*), *Diabetologia*, Vol. 5, Issue: 6, **1969**, pp. 379-383.
- Al-Achi A.**, Herbs that affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care*, Vol.8, Issue: 7, **2005**, pp. 325-330.
- Al-Bayati F.A.**, Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 116, Issue: 3, **2008**, pp. 403–406.
- Ali-Shtayeh M.S.**, Yaghmour R.M., Faidi Y.R., Salem K., Al-Nuri M.A., Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 60, Issue: 3, April **1998**, pp. 265- 271.
- Ali-Shtayeh M.S.**, Mathew B., Flora of Pakistan. Karachi University Press, Karachi, Pakistan, **2000**.
- Alma M.H.**, Mavi A., Yildirim A., Digrak M., Hirata T., Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 26, Issue: 12, **2003**, pp.1725–1729.
- Arnao M.B.**, Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 11, Issue: 11, **2000**, pp. 419-421.
- Arpino P.**, Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. II, Techniques-Ingénieur, **2008**, pp.1491–2,4.

- Azevedo** N.R. & Ferri P.H., Chemical variability in the essential oil of *Hyptissu aveolens*. *Phytochemistry*, vol. 57, Issue: 5, **2001**, pp.733.
- Babu** V., Gangadevi T., Subramonian A., Antidiabétique activity of ethanol extract of *Cassia Klainii* leaf in streptozotocin induced diabetic rats and isolation of an active fraction and toxicity evaluation of the extract. *Indian Journal of Pharmacology*, Vol. 35, **2003**: pp. 290-296.
- Bagard** S., Physique-Chimie 1e S: Tout-en-un, Ed. Bréal, **2008**, pp. 128.
- Barboni** T., 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, Thèse de doctorat, Université de Corse, **2006**, pp.21.
- Barros** L., Calhelha R.C., Vaz J.A., Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Estevinho L.M., Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild *edible mushrooms* methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, Vol. 225, Issue: 2, **2007**, pp. 151–156.
- Baser** K.H.C., Buchbauer G. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications, CRC Press NW., **2010**, pp. 48.
- Belaiche** T., Tantaoui-Elaraki A., Ibrahimy A., Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes, *Sciences Des Aliments*, Vol. 15, Issue: 6, **1995**, pp. 571-578.
- Belenkii** N., Sakharova E., Orach as a source of vitamin A. Klim-ReferatZhur; **1939**: 12: 40.
- Belouahem** D., Belouahem F., Belair G., Floristic biodiversity and vulnerability of *Glutinous aulnaies* in Numidia Algeria (NE Algeria). *European Journal of Scientific Research*, Vol. 32, Issue: 3, **2009**, pp.329–361.
- Benhammou** N., Bekkara F.A., Panovska T.K., Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*, *Comptes Rendus Chimie*, Vol. 12, Issue: 12, **2009**, pp.1259-1266.
- Benzie** I.F., Strain J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, Vol. 239, Issue: 1, **1996**, pp.70-76.
- Benzie** I.F., Chung W.Y., Strain J.J., Antioxidant (reducing) efficiency of ascorbate in plasma is not affected by concentration. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 10, Issue: 3, **1999**, pp. 146-150.
- Bernard** B., Plantes médicinales du monde: réalités & croyances, Ed. Estem, **2001**, pp. 85-86.
- Berset** C., Cuvelier M.E., Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des aliments*, Vol. 16, Issue: 3, **1996**, pp. 219-245.
- Bhaskar** A., Vidhya V.G., Ramya M., Hypoglycaemic effect of *Mucuna pruriens* seed extract on normal and streptozotocin–diabetic rats. *Fitoterapia*, Vol. 79, Issue: 7-8, **2008**, pp. 539-43.

Bicchi C., Rubiolo P., Analysis of constituents of iris rhizomes. Part I: high performance liquid chromatographic-particle beam-mass spectral analysis of iridals from *Iris pallida* rhizomes. *Phytochemical Analysis*, Vol.4, Issue: 4, July/August **1993**, pp. 171–177.

Bicchi C., Fresia M., Rubiolo P., Monti D., Franz C., Goehler I., Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 12, Issue: 1, **1997**, pp. 47–52.

Blois M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**; Vol. 181, pp. 1199–1200.

Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical Scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, Vol. 186, **1990**, pp. 343-355.

Bossard R., Cuisance P., Arbres, Arbustes d'ornement des régions tempérées et méditerranéennes. Diffusion Lavoisier. **1984**.

Borullard B., Dictionnaire: Plantes et champignons, **1997**, pp.73.

Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi F., Hakim Y., Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Revue « *Nature et Technologie* », Vol.3, **2010**. pp. 37-45.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, Vol. 28, Issue: 1, **1995**, pp. 25-30.

Brenna E., Fuganti C., Serra S., Changing the odor properties of commercial mixtures of α -irones by simple chemical transformations. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 16 Issue 4, July **2004**, pp. 339-341.

Bruneton J., Éléments de phytochimie et de Pharmacognosie, Technique & Documentation Lavoisier, **1987**, pp. 230.

Bruneton J., Pharmacologie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} Edition, Tec & Doc, **1999**, pp.416, 417.

Calapai G., Corica F., Corsonello A., Sautebin L., Di Rosa M., Campo G.M., Buemi M., Nicita Mauro V., Caputi A.P., Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 104, Issue: 7, 1999, pp. 975-982.

Castroviejo S., Lainz M., Lopez Gonzalez G., Montserrat P., Munoz Garmendia F., Paiva J., Villar L., *Flora Iberica Plantanaceae-Plumbaginaceae* (partim), Real Jardin Botanico, Ed, CSIC, Madrid. Vol. 2, **1990**, pp. 503-513.

Cavalli J.F., Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar, Thèse de doctorat, **2002**, pp.3.

Cerasi E., Kaiser N., Grosse D.J., From sand rats to diabetic patients: Is non-insulin-dependent diabetes mellitus a disease of the β cell ?. *Diabetes and metabolism*, Vol. 23, **1997**, pp. 47-51.

- Chalbi N.**, Demarly Y., L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides, John Libbey Eurotext, **1991**, pp.67.
- Charles D. J.**, Simon J. E., A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum*. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 4, Issue:3, **1992**, pp. 231-234.
- Chavéron H.**, Molécules toxiques. Dans « Introduction à la toxicologie nutritionnelle », TEC & DOC, Lavoisier, Paris, **1999**, pp. 98.
- Chen Y.C.**, Sugiyama Y., Abe N., Kuruto-Nima R., Nozawa R., Hirota A., DPPH radical scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 69, Issue: 5, **2005**, pp. 999–1006.
- Chen V.**, Ianuzza C.D., Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol. 60, Issue: 10, **1981**, pp. 1251-1256.
- Cherkaoui-Tangi K.**, Lachkar M., Wibo M., Morel N., Gilani A.H., Lyoussi B., Pharmacological studies on hypotensive, diuretic and vasodilator activities of chrysin-glucoside from *Calycotome villosa* in rats. *Journal of Phytotherapy Research*, Vol.22, Issue: 3, Mar **2008**, pp.356-361.
- CLSI**, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, Vol. 26, Issue: 2, **2006**.
- CLSI**, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, Vol. 22, Issue: 15, **2002**.
- Comhair S.A.**, Erzurum S.C., Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol. 283, Issue: 2, **2002**, pp. 246-55.
- Conforti F.**, Rigano D., Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass, relevant to treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol.25, Issue: 1, **2010**, pp. 97-104.
- Cosentino S.**, Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. & Palmas F., *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 29, Issue: 2, **1999**, p.130-135.
- Couplan F.**, Le régal végétal: Plantes sauvages comestibles, Ed. Ellebore, **2009**, pp.86.
- Coupla F.**, Les plantes et leurs noms: Histoires insolites, Ed. Quae, **2012**, pp.187.
- Council of Europe**, Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A, Ed. Sainte Ruffine, France. **1996**.

- Crichton R.R.**, Wilmet S., Legssyer R., Ward R.J., Molecular and Cellular Mechanisms of Iron Homeostasis and Toxicity in Mammalian Cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol.91, Issue: 1, 25, **2002**, pp. 9–18.
- Dangles O.**, Dufour C., Manach C., Rémésy C., Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods in Enzymology*, Vol. 335, **2001**, pp. 319-333.
- Deshuparabhu S.B.**, The Wealth of India. *Publication and Information Directorate, CSIR, New Delhi. 1959.*
- Dessi M.A.**, Deiana M., Rosa A., Piredda M., Cottiglia F., Bonsignore L., Deidda D., Pompei R., Corongiu F.P., Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia. *Journal of Phytotherapy Research*, Vol. 15, Issue: 6, September **2001**, pp. 511–518.
- Diebolt M.**, Effets pharmacologiques des polyphénols végétaux sur la vasomotricité et études des mécanismes dans un modèle de vaisseaux humains reconstitués par ingénierie tissulaire, Université Laval, **2003**.
- Domínguez E.**, *Calicotome villosa* Link. (Ed. Ketres) Valdés B., Talavera. S., Fernández-Galiano E., *Flora Vasculare de Andalucía Occidental*, Vol. 2, **1987**, pp. 45-170.
- Dorman H.J.**, Deans S.G., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.88, Issue: 2, **2000**, pp. 308-316.
- Eklund P.C.**, Langvik O.K., Warna J.P., Salmi T.O., Willfor S.M., Sjöholm R.E., Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry*, Vol. 3, Issue: 18, **2005**, pp. 3336–3347.
- El Antri A.**, Lachkar N., El Hajjaji H., Gaamoussi F., Lyoussi B., El Bali B., Morel N., Allouchi H., Lachkar M., Structure elucidation and vasodilator activity of methoxyflavonols from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Arabian Journal of Chemistry*, Vol.3, Issue: 3, July **2010**, pp.173–178.
- El Antri A.**, Messouri I., Bouktaib M., El Alami R., Bolte M., El Bali B., Lachkar M., Isolation and X-ray Crystal Structure of Tetrahydroisoquinoline Alkaloids from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Molecules*, Vol. 9, **2004**, pp. 650-657.
- El Antri A.**, Messouri I., Chendid Tlemcani R., Bouktaib M., El Alami R., El Bali B., Lachkar M. Flavone glycosides from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Molecules*, Vol. 9, Issue: 7, **2004**, pp.568-573.
- El Antri A.**, Messouri I., Bouktaib M., El Alami R., Bolte M., El Bali B., Lachkar M., Isolation and X-ray crystal structure of a new isoquinoline-N-oxide alkaloid from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Fitoterapia*, Vol.75, Issue: 7-8, Dec**2004**, pp.774-8.

- El Kalamouni C.**, Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Doctorat de l'Université de Toulouse, institut National Polytechnique de Toulouse, spécialité : Sciences des Agro ressources, **2010**, pp.107.
- Emam S.S.**, Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. *Journal of Natural Products*, Vol. 4, **2011**, pp. 25-41.
- Epifano F.**, Marcotullio M.C., and Menghini L., Constituant of *Phagnalon sordidum*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol.38, issue: 2, **2002**, pp. 204-205.
- Erdogan Orhan I.**, Senol F.S., Demirci B., Ozturk N., Baser K.H.C., Sener B., Phytochemical Characterization of *Phagnalon graecum* Boiss. by HPLC and GC-MS with its Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activity Profiling by Spectrophotometric Methods. *Food Analytical Methods*, Vol. 6, Issue: 1, **2012**, pp. 1-9.
- Esplin A.C.**, Greaves G.E., Stoddart L.A., Composition of forage plants and use of supplements (On Utah's winter range). *Utah Agricultural Experiment Station Bulletin*. Vol. 277, **1937**, pp.4-48.
- Fagherazzi G.**, Facteurs alimentaires, composantes du syndrome métabolique et risques de cancer du sein et de diabète de type II dans la cohorte E3N. Thèse de Doctorat, Université Paris XI, **2011**, pp.28.
- Fang R., Houghton P.J., Luo C., Hylands P.J., Isolation and structure determination of triterpenes from *Iris tectorum*. *Phytochemistry*, Vol. 68, Issue: 9, May **2007**, pp.1242-1247.
- Fang R., Houghton P.J., Hylands P.J.**, Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 118, Issue: 2, Jul **2008**, pp.257-263.
- Fernandez X.**, Cabrol-bass D., Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. Sept. **2007**, pp. 3233-5, 10.
- Folin C.**, Ciocalteu V., Tyrosine and tryptophan determination in protein. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.73, **1927**, pp. 627-650
- Formica J.V.**, Regelson W., Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, Vol.33, Issue 12, **1995**, pp. 1061–1080.
- García Murillo P.**, *Calycotome villosa* Link. (Real Jardín Botánico) Castroviejo & al. (eds.), *Flora iberica*, Vol.7, **1999**, pp.182-184.
- Garnero J.**, Joulain D., Buil P., Effect of storage of iris rhizomes on the composition of iris essential oil or concrete and some new constituents. *Rivista italiana EPPOS*, Vol. 60, **1978**, pp.568–590.
- Gibbons S.**, Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, Vol. 74, Issue: 6, **2008**, pp. 594-602.

- Girard-lalancette K**, Mémoire de la maîtrise en ressources renouvelables, Université du Québec à Chicoutimi, **2009**, p.18.
- Goehler I**, Domestikation von Medizinalpflanzen und Untersuchungen zur Inkulturnahme von *Tagetes lucida* Cav. Dissertation an der Universität für Bodenkultur Wien. **2006**.
- Gongora L**, Manez S., Giner R.M., Recio M.C., Gray A.I., Rios J.L., Phenolic glycosides from *Phagnalon rupestre*. *Phytochemistry*, Vol.59, Issue: 8, April, **2002**, p.857-860.
- Govindarajan R**, Rastogi S., Vijayakumar M., Shirwaikar A., Rawat, A.K.S., Mehrotra S., Pushpangadan P., Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 26, Issue: 10, **2003**, pp. 1424–1427.
- Halimi A**, Les plantes médicinales en Algérie, 1^{ère} édition, Edition DERTI, Alger, **2004**, pp.214.
- Harborne J.B.**, *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Ed. Springer, **1998**.
- Harie A.N.**, Utilization of wildy growing edible plants as means of counteracting a vitaminoses A & D. *Miditsin Stestra*. Vol. 6, **1947**, pp. 25-26.
- Harley J.P.**, Klein D.A., Prescott L.M., Sherwood L.M., Willey J.M., Woolverton C.J. *Microbiologie*, Ed. De Boeck, **2010**.
- Hausen B.M.**, Schulz K.H., On sensitizing capacity of naturally occurring quiones.3.new contact allergen (2-dimethylallyl-1, 4-benzoquinone) from Phagnalon. *Planta Medica*, Vol. 32, Issue: 3, **1977**, pp.287-296.
- Hawana F.**, Tahara S., Mizutani J., Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry*, Vol. 30, Issue: 1, **1991**, pp. 157–163.
- Hensen L.**, Hammershøy O., Boll P.M., Allergic contact dermatitis from faltarinol isolated from *Schefflera arboricola*. *Contact Dermatitis*, Vol. 14, Issue:2, **1986**, pp.91–93.
- Huang D.**, Ou B., Prior R.L, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, Issue: 6, **2005**, pp. 1841–1856.
- Hubert J.**, Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, Spécialité: Qualité et sécurité des aliments, **2006**, pp. 174.
- Hullé M.**, Association Technique Agricole, Evelyne Turpeau-Ait, les pucerons des plantes maraichers : cycles biologiques et activité de vol, Ed. Quae, **1999**, pp.13.
- Inouye S.**, Tsuruoka T., Watanabe M., Takeo K., Akao M., Nishiyama Y., Yamaguchi H. *Mycoses*, **2000**, 43, pp.17–26.

Iris F.F., Benzie I.F., Strain, J.J., Ferric reducing antioxidant power assay. *Methods Enzymol.*, Vol. 299, **1999**, pp. 15–27.

I.S.L.I., Safety assesment and health benefites of food components based on selected scientific criteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 39 Issue: 3, **1999**, pp. 203.

Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A., Microbiologie médicale, Ed. Presses Université Laval, **1973**, pp. 629.

Jenis J., Burasheva G.S., Aisa H.A., Hang B.A., Abilov Z.A., Volatile Constituents from *Atriplex tatarica*, *Natural Product Research and Development*, **2010**, Vol. 22, Issue: 6, pp. 1040-1044.

Jones J.D., Dangl J.L., The plant immune system. *Nature*, Vol. 444, **2006**, pp. 323-329.

Kano M., Takayanagi T., Harada K., Makino K., Ishikawa F., Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoera batatas* cultivar Ayamurasaki. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 69, Issue: 5, **2005**, pp.979-88.

Kalemba D., Kunicka A., Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, Vol.10, Issue: 10, **2003**, pp. 813-829.

Karioti A., Hadjipavlou-Litina D., Mensah, M.L., Fleischer, T.C., Skaltsa H., Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiiiaa ethiopica* (Dun). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, Issue: 26, **2004**, pp. 8094-8098.

Kelley B D., Goodin J R., Miller D.R., Biology of *Atriplex* in: Contribution to the ecology of halophytes. *Tasks for Vegetation Science*, Vol. 2, **1982**, pp. 79-107.

Kim H.J., Chen F., Wu C., Wang X., Chung, H.Y., Jin Z., Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, Issue: 10, **2004**, pp. 2849–2854.

Kinsella J.E., Frankel E., German B., Kanner J., Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, Vol. 47, Issue: 4, **1993**, pp. 85-89.

König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, **2001**.

Lamendin H., Soignez votre bouche par les plantes: Remèdes d'hier et d'aujourd'hui, Ed. L'Harmattan, **2007**, pp.86.

Laverdière F., Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G., Dossier *Couplage*, **1999**, pp.21.

Lawrence B.M., A planning scheme to evaluate new aromatic plants for the flavor and fragrance industries, Ed. New crops, Wiley, New York, **1993**, pp. 620-627.

LeHouéron H.N., The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review. *Agroforestry systemes*, Vol. 18, Issue: 2, **1992**, pp. 23-24.

- Loy G.**, Cottiglia F., Garau D., Deidda D., Pompei R., Bonsignore L., Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves, *Il Farmaco*, Vol. 56, Issues: 5–7, July **2001**, pp. 433–436.
- Lucchesi M.E.**, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à L'extraction des Huiles Essentielles, Thèse de Doctorat, **2006**, pp. 56, 59.
- MacDonald-Wicks L.K.**, Wood L.G., Garg M.L., Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.86, Issue: 13, **2006**, pp.2046-2056.
- Magalhaes L.M.**, Segundo M.A., Reis S., Lima J.L., Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 613, Issue: 1, 2008, pp. 01–19.
- Maire R.**, Centrospermales (Chenopodiaceae), Sect. Teutlioides Ulbrich, in : Quezel P. (Ed.), Flore de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara), VIII. Dicotyledonae, Paul Lechevalier, Paris, **1962**, pp. 81–84.
- Marc F.**, Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P., Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S: Médecine Sciences*, Vol. 20, Issue: 4, **2004**, pp.458-463.
- Marles R.J.**, Farnsworth N.R., Plants as sources of antidiabetic agents. *Economic and Medicinal Plant Research*, Vol. 6, **1994**, pp. 149-187.
- McKell C.M.**, Salinity in *Atriplex* species: fodder shrubs of arids lands. In: Handbook of plant and crop physiology. Ed. Pessaraki M. and Marcel Dekker, **1994**.
- Malecky M.**, Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, Thèse de doctorat, Agro Paris Tech, **2008**, pp.13.
- Marcheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., Les composés phénoliques des végétaux: Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, Ed. PPUR presses polytechniques, **2005**, pp.151.
- Marin M.**, Giner Rosa M., Carmen Recio M., Phenylpropanoid and phenylisoprenoid metabolites from *Asteraceae* species as inhibitors of protein carbonylation. *Phytochemistry*, Vol.72, Issue: 14-15, October **2011**, pp.1821-1825.
- Marriotta P.-J.**, Shelliea R., Cornwellb C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, Vol. 936, Issues: 1–2, **2001**, pp. 1–22.
- Martínez J.P.**, Ledent J.F., Bajji M., Kinet J.M., Lutts S., Effect of water stress on growth, Na⁺ and K⁺ accumulation and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of *Atriplex halimus* L. *Plant Growth Regulation*. Vol. 41, Issue: 1, **2003**, pp. 63-73.

Maurer B., Hauser A., Froidevaux J.C., New irone-related constituents from the essential oil of *Iris germanica* L. *Helvetica Chimica Acta*, Vol.72, Issue: 6, September **1989**, pp.1400–1415.

Mertz W., Rosinski E.E., Gordon W.A., Harrison W.W., Shani J., Sulman F.G., *In vitro* potentiating of insulin by ash from Saltbush (*Atriplex halimus*). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, Vol. 206, Issue: 1, **1973**, pp.121-182.

Michel T., Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Thèse de Doctorat de l'Université d'Orléans, Ecole Doctorale Sciences & Technologies. Institut de Chimie Organique et Analytique, **2011**, pp.183.

Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M., Simin N., Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, Issue: 9, **2004**, pp. 2485–2489.

Mimura T., Yazaki K., Sawaki K., Ozawa T., Kawaguchi M., Hydroxyl radical scavenging effects of guaiacol used in traditional dental pulp sedation: Reaction kinetic study. *Biomedical Research* (Tokyo), Vol. 26, Issue: 4, **2005**, pp. 139–145.

Miyatke Y., Ito H., Yashida T., Identification of iridals as piscicidal components of iridaceous plants and their conformations associated with CD spectra. *Revue Canadienne de Chimie*, Vol. 75, Issue: 6, **1997**, pp. 734-741.

Molyneux P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn. Journal of Science and Technology*, Vol. 26, Issue: 2, **2004**, pp. 211-219.

Mosta N.M., Essential oil yield and composition of *Rosescented geranium* (*Pelargonium* sp) as influenced by harvesting frequency and plant shoot age. Thesis of Doctorat MSC Agronomy, faculty of natural and agricultural sciences, University of Pretoria, South Africa, **2006**.

Muanda F.N., Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine, Metz, **2010**, pp.77.

National Institute of Standards and Technology, PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, **1999**.

National Institute of Standards and Technology, NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database, Gaithersburg, MD.[<http://webbook.nist.gov/chemistry/>], **2005**.

Négre R., Petite flore des régions arides du Maroc occidental. Tome I. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris (France), **1961**.

Newman A.A., Chemistry of Terpenes and Terpenoids, Academic Press, London, New York, **1972**.

- Nilsson J.**, Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, A., Akesson, B., Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol.49, **2005**, pp. 239–246.
- Normard D.**, Paquis J., Manuel d'identification des bois commerciaux, Tome 2, Ed. Quae, **1976**, pp. 208.
- Oyaizu M.**, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, Vol. 44, **1986**, pp. 307–315.
- Ozcelik B.**, Lee J.H., Min D.B., Effects of light, oxygen and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, Vol. 68, Issue: 2, **2003**, pp. 487-490.
- Palsamy P.S.**, Resveratrol S., A natural phytoalwin, normalizes hyperglycemia in STZ-nicotinamide induced experimental diabetic rat. *Biomedicine Pharmacotherapy*, Vol. 62, **2008**, pp. 598-605.
- Paltz J.G.**, Le Fascinant Pouvoir des Huiles Essentielles. Fascicule du Laboratoire « Jacques Paltz », **1997**.
- Paolini J.**, Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE ET IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéracée endémiques de corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*, Thèse de doctorat, Université de Corse **2005**, p.26, 38.
- Pibiri Cécille M.**, Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de doctorat, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, **2006**.
- Portes E.**, Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes: Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse de Doctorat, Université Bordeaux I, **2008**, pp.53.
- Pridham J-P.**, Terpenoids in Plants, Academic Press, London, New York, **1967**.
- Pushpangadan P.**, Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 26, Issue: 10, **2003**, pp. 1424–1427.
- Qaiser M.**, Lack H.W., The Genus Phagnalon (*Asteraceae*, *Inuleae*) in Arabia. *Journal of Willdenowia*, Vol. 15, Issue: 1, Jul **1985**, pp. 3-22.
- Qaiser, M.**, Lack, H.W., The Genus Phagnalon (*Asteraceae*, *Inuleae*) in Tropical Africa. *Journal of Willdenowia*, Vol. 15, Issue: 2, Feb **1986**, pp. 437-450.
- OMS.** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour **2002-2005**, WHO /EDM /TRM /2002.1
- Quèzel P.**, Santa S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome2, Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, **1963**, pp.935-936.

- Rahman** A.U, Nasim S., Baig I., Jalil S., Orhan I., Sener B., Choudhary M.I., Antiinflammatory isoflavonoids from rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.86, Issue: 2-3, Jun 2003, pp. 177-180
- Rhayour K.**, Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de Doctorat, 2002, pp.9,10,17.
- Ricci D.**, Fraternali D., Giamperi L., Bucchini A., Epifano F., Burini G., Curini M., Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 98, Issue: 1-2, **2005**, pp. 195–200.
- Rice-Evans C.A.**, Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B., The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavoids, *Free Radical Research*, Vol. 22, Issue: 4, **1995**, pp. 375-383.
- Richard S.**, Steele-Moore L., Goodwin A.C., Antimicrobial susceptibility testing protocols Ed. Goodwin Boca Raton: CRC Press, **2007**, pp.77.
- Robards K.**, Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, Vol. 66, Issue: 4, **1999**, pp. 401–436.
- Rodriguez S.A.**, **Murray A.P.**, Antioxidant activity and chemical composition of essential oil from *Atriplex undulate*. *Natural Product Communications*, Vol.5, Issue: 11, 2010, pp.1841-1844.
- Roger B.**, Fernandez X., Jeannot V., Chahboun J., An alternative method for irones quantification in iris rhizomes using headspace solid-phase microextraction. *Phytochemical Analysis*, Vol.21, Issue: 5, 2010, pp.483-488.
- Rolland Y.**, Antioxydants naturels végétaux, *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, Vol. 11, Issue: 6, **2004**, pp. 419-24.
- Roux D.**, Les nouvelles plantes qui soignent. Ed. S.a.m., **2005**, pp. 31.
- Safaei-Ghomi J.**, Ebrahimabadi A.H., Djafari-Bidgoli Z., Batooli H., GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chemistry*, Vol. 115, Issue: 4, 15, **2009**, pp.1524–1528.
- Salgues R.**, Sur quelques huiles essentielles nouvelles ou peu connues. *Materiae Vegetables*, Vol. 1, Issue: 2, **1963**, pp. 139-147.
- Salgues R.**, Etude botanique, chimique et toxicologique de diverses espèces d'*Atriplex* L. (Tourn.) (Chénopodiacées), *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, Vol. 9, Issue: 2, **1962**, pp.71-102.

- Sanchez-Moreno C.**, Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science and Technology International*, Vol. 8, Issue: 3, **2002**, pp. 121-137.
- Sanoner P.**, Guyot S., Marnet N., Molle D. Drilleau J.F., Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 47, Issue: 12, **1999**, pp. 4847–4853.
- Sanoner P.**, Les polyphénols de la pomme à cidre: diversité variétale et oxydation. Thèse de Doctorat, Université de Caen, **2001**, pp.316.
- Schütz C.**, Quitschau M., Hamburger M., Potterat O., Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC–PDA–MS analysis. *Fitoterapia*, Vol. 82, Issue: 7, October **2011**, pp.1021–1026.
- Schwalbe R.**, Steele-Moore L., Goodwin A.C., Antimicrobial susceptibility testing protocols Ed.Goodwin Boca Raton: CRC Press, **2007**, pp.75–79.
- Senatore F.**, Formisano C., Grassia A., Rigano D., Bellone G., Bruno M., Chemical Composition of the Essential Oil of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass. (Asteraceae) Growing Wild in Southern Italy. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, Vol. 8, Issue: 3, **2005**, pp.258-263.
- Shani J.**, Ahronson Z., Sulman F.G., Mertz W., Frenkel G., Kraicer P.F., Insulin-potentiating effect of saltbush (*Atriplex halimus*) ashes. *Israel Journal of Medical Sciences*, Vol. 8, Issue: 6, **1972**, pp.757-758.
- Sharma O.P.**, Bhat T.K., DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, Vol.113, Issue: 4, **2009**, pp. 1202–1205.
- Singh N.**, Mahmood U., Kaul V.K., Gupta A. P., Jirovetz L., A new alkylated benzoquinone from rhizomes of *Iris kumaonensis*. *Natural Product Research*, Vol.20, Issue: 1, January **2006**, pp.75-78.
- Sokmen M.**, Serkedjieva J., Daferera D., Gulluce M., Polissiou M., Tepe, B., Akpulat H.A., Sahin F., Sokmen A., In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, Issue: 11, **2004**, pp. 3309–3312.
- Stephens J.**, le rat de laboratoire. Edition: Paris, **2008**.
- Talamali A.**, Dutuit P., Le Thomas A., Gorenflot R., Polygamie chez *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Séries III - Sciences de la Vie*, Vol. 324, Issue 2, **2001**, pp. 107-113.
- Talamali A.**, Gorenflot R., Dutuit P., Hétérostylie intra-individuelle chez *Atriplex halimus* L. (Amaranthaceae). *Comptes Rendus Biologies*, Vol. 330, Issue : 12, **2007**, pp. 871-879.

- Talavera S.**, Aedo C., Castroviejo S., Romero C., Sáez L., Salgueiro F.J., M. Velayos., *Calycotome villosa* Link. (Real Jardín Botánico) Castroviejo & al. (eds.), *Flora iberica*, Vol. 7, **1999**, pp.3-10.
- Tardif J.**, Société des amis de jardin Vaan Den Hende, Université Laval, Une visite de jardin Roger-Van Den, Un parcours de l'évolution des végétaux, Ed. Illustrated, **2003**, pp. 137.
- Tepe B.**, Sokmen M., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *roslans*, *Journal of Food Engineering*, Vol. 66, Issue: 4, **2005**, pp. 447-454.
- Tepe B.**, Sihoglu-Tepe A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Chemical composition and activity of the essential oil *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry*, Vol.103, Issue:3, **2007**, pp.766-770.
- Tzakou O.**, Bazos L., Yannitsaros A., Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 22, Issue: 5, **2007**, pp. 358–362.
- Vardar-Ünlü G.**, Candan F., Sökmen A., Daferera D., Polissiou M., Sökmen M., Dönmez E., Tepe B., Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.51, Issue: 1, **2003**, pp. 63–67.
- Vila R.**, Mundina M., Tomi F., Fursan R., Zacchino S., Casanova J., Canigüeral S., Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*, Vol. 68, **2002**, pp. 164-167.
- Walters C.**, Aromathérapie, Guide illustré du bien-être, Ed. Konemann, Paris, **1999**, pp. 8, 14.
- Wagner J.A.** Early clinical development of pharmaceuticals for type 2 diabetes mellitus: from preclinical models to human investigation. *The Journal of Clinical endocrinology and Metabolism*, Vol. 87, Issue: 12, **2002**, pp. 5362-5366.
- Wollenweber E., Stevens J.F., Klimo K., Knauft J., Frank N., Gerhäuser C., Cancer, chemopreventive *in vitro* activities of isoflavones isolated from *Iris germanica*. *Planta Medica*, Vol.69, Issue: 1, Jan **2003**, pp. 15-20.
- Wright S.**, Keele C.A., Neil E., Physiologie appliquée à la médecine, 2^{ème} Edition Flammarion-Sciences, Paris, **1980**.

LISTE DES TRAVAUX

LISTE DES TRAVAUX

I. Publications dans des journaux internationaux à comités de lecture

[PT1] Ilyas CHIKHI; Hocine ALLALI; Mohamed El Amine DIB; Noureddine HALLA; Alain MUSELLI; Boufeldja TABTI; Jean COSTA

“Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of *Iris planifolia* (Mill) from Algeria”, *Journal of Medicinal Plants Research (JMPR)*, **2012**, Vol. 6(10), 16 Mars, 1961-1968.

Available online at: <http://www.academicjournals.org/JMPR>

[PT2] Nawel MELIANI ; Mohammed El Amine DIB ; Amel BENDIABDELLAH, Nassim DJABOU ; Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Boufeldja TABTI

“Evaluation of antioxidant activity of essential oil and extracts from Algerian *Daucus carota* L. aerial parts”, *The Global Journal of Pharmaceutical Research*, 10 December **2012**, Vol. 1 (5), 1121-1129.

Available free online at: <http://www.tgjpr.com>

[PT3] Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Mohammed El Amine DIB ; Djamila MERGHACHE ; Houria MEDJDOUB ; Boufeldja TABTI

“Antioxidant activities and phytochemical study of extracts of two phagnalons species growing in Algeria”, *International Journal of Traditional and Herbal Medicine (IJTHM)*, Vol. 1(3), **2013**, pp. 49-53.

Available online at: <http://www.ijthmjournal.com>

[PT4] Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Mohammed El Amine DIB ; Alain MUSELLI ; Nassim DJABOU ; Boufeldja TABTI ; Noureddine HALLA ; Jean COSTA

“Chemical composition, antimicrobial activity and free radical scavenging capacity of the essential oil and ethanol extract of *Calycotome villosa* ssp. *intermedia* from Algeria”, *Journal of Essential Oil Bearing Plants (JEOBP)*, **2013**.

Available online at: jeobp@yahoo.co.in & jeobp@rediffmail.com

[PT5] Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Mohamed El Amine DIB ; Houria MEDJDOUB ; Boufeldja TABTI

“Antidiabetic activity of aqueous aerial part extract of *Atriplex halimus* L.(Chenopodiaceae) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (APJTB), **2014**.

Available online at: <http://www.apjtb.com>

[PT6] Hocine ALLALI ; Ilyas CHIKHI ; Mohamed El Amine DIB ; Alain MUSELLI ; Nadia FEKIH ; Nawel MELIANI ; Mohammad A. KAMAL ; Boufeldja TABTI ; Jean COSTA

“Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and Hydrodistillation”, *Natural Products: An Indian Journal*, **2013**, Vol.9, Issue 6, 258-263.

Available online at: <http://cta@tsijournals.com>

II. Communications

1) Hocine ALLALI ; Ilyas CHIKHI ; Rachid Tarik BOUHRAOUA ; Latifa BELHOUCINE ; Belkheir DAHANE

“ Composition chimique & variabilité du liège de *Quercus suber* L. d’Algérie ”. Deuxièmes Rencontres Méditerranéennes Chercheurs-Gestionnaires-Industriels « *La Gestions des Subérais et la Qualité du liège* », 17-19 Octobre **2011**, Jijel – Algérie.

2) Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Mohamed El Amine DIB ; Houria MEDJDOUB ; Noureddine HALLA ; Kebir BOUCHERIT ; Boufeldja TABTI

“ *Évaluation des Activités Antimicrobienne et Antioxydante de l’Huile Essentielle et des Extraits de Calycotome villosa ssp. intermedia de l’Ouest Algérien* ”, III^{ème} Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 11 & 12 avril **2012**, Mostaganem – Algérie.

3) Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Mohamed El Amine DIB ; Alain MUSELLI ; Noureddine HALLA ; Boufeldja TABTI ; Jean COSTA

“ Determination of antioxidant and antibacterial activities of various extracts and essential oil compositions of *Iris planifolia* (Mill.) ”, Congrès International sur les Plantes Aromatiques & Médicinales CIPAM2012, 8-10 Mai **2012**, Sidi Bel Abbès – Algérie. <http://cipam2012.univ-sba.dz>.

III. Textes des Publications

[PT1] *Iris planifolia*:

Ilyas CHIKHI; Hocine ALLALI; Mohamed El Amine DIB; Nouredine HALLA; Alain MUSELLI; Boufeldja TABTI; Jean COSTA

“Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of *Iris planifolia* (Mill) from Algeria”, *Journal of Medicinal Plants Research* (JMPR), **2012**, Vol.6 (10), 16 Mars, 1961-1968.

Full Length Research Paper

Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of *Iris planifolia* (Mill) from Algeria

Ilyas Chikhi¹, Hocine Allali¹, Mohamed El Amine Dib^{1*}, Noureddine Halla³, Alain Muselli², Boufeldja Tabti¹ and Jean Costa²

¹Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université Abou Bekr Belkaïd, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.

²Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, UMR CNRS 6134, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France.

³Laboratoire des antibiotiques, antifongique: physique chimie, synthèse et activité biologique, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, 13000, Algérie.

Accepted 9 January, 2012

Free radical scavenging and antibacterial activity of essential oil and solvent extracts of *Iris planifolia* (Mill) was investigated. The essential oil was analyzed by Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and a total of 38 types of volatile organics were identified. The essential oil consists chiefly of alkanes (36.5%), acids (19.1%), ketones (11.7%), alcohols (9.0%), arylpropanoids (6.8%) and aldehydes (4.1%) accompanied by relatively much smaller amounts of monoterpenes (1.0%). The antimicrobial activity of essential oil and ethanolic extract shows an important activity against *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae* with minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.12 mg/ml. Furthermore, the free radical scavenging assay of the essential oil and extracts were determined using a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test system. The dichloromethane and water extract possessed strong radical scavenging activity with the lowest IC₅₀ value of 0.1 mg/ml followed by the aqueous extract with an IC₅₀ value of 0.12 mg/ml. Phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, terpenoids, saponins, alkaloids and tannins which may be responsible for antimicrobial and antioxidant activities.

Key words: *Iris planifolia* (Mill), essential oil, GC, GC/MS, phytochemical prospecting, antimicrobial and free radical scavenging.

INTRODUCTION

Aromatic plants have long been part of Algerian cultures and their uses are wide spread in most of the rural people that rely on traditional therapies which involve the use of plant parts, their extracts, infusions and decoctions, especially in diabetes, high blood pressure, arthritis, fever and cancer (Quezel and Santa, 1963; Allali et al., 2008). That could be explained partially by the presence of wide variety of biologically active constituents. On the other hand, in modern medicine due to indiscriminate and

irrational use of antimicrobial drugs the infectious microorganisms have developed resistance. Hence, new alternative are required to combat the existing diseases as infections and cancer. Plants produce a wide variety of secondary metabolites such as vitamins, terpenoids, tannins, flavonoids, alkaloids and other metabolites, which are rich in antimicrobial and antioxidant activities (Wong et al., 2006; Baker et al., 2010). A great number of different spices and aromatic herbs have been tested for their antioxidant and antimicrobial activities during the last decade; however, there are still many plants, which were not yet examined. The genus *Iris* belongs to family *Iridaceae*, consists of about 300 species and is distributed throughout the world except in the cold

*Corresponding author. E-mail: a_dibdz@yahoo.fr. Tel/Fax: +213 43286530.

regions.

In Algeria, the genus *Iris* is mainly represented by three species (*Iris pseudo acorus*, *Iris unguicularis* and *Iris planifolia*) (Belouahem-Abed et al., 2009). Plants of the genus *Iris* have been previously recognized as rich sources of secondary metabolites and are used in the treatment of cancer, inflammation and bacterial and viral infections (Choudhary et al., 2001; Orhan et al., 2003; Atta-ur-Rahman et al., 2003). A local ethnobotanical survey carried out showed its possible anti-tumoral activity. Previous phytochemical investigations on *Iris plants* have resulted in the isolation of a variety of compounds, including flavonoids, isoflavonoids and their glycosides, benzoquinones, triterpenoids and stilbene glycosides (Atta-ur-Rahman et al., 2003; Choudhary et al., 2001). This genus is rich in isoflavonoids which have a wide range of biological activity including antiinflammatory, antioxidant and cancer chemopreventive properties (Rahman et al., 2003; Wollenweber et al., 2003). *Iris* rhizomes are also popular in cosmetic preparations, and *Iris* oil is regarded as one of the most precious ingredients in perfumery (Cornelia Schütz et al., 2011). *Iris planifolia* (Mill.), locally known as kessar el touadjine, nouar si Messaoud, bou chahla, is widely distributed in Algeria, Crete, Greece, Italy, Libya, Morocco, Portugal, Sardinia, Sicily and Spain. The plant grows to about 20 cm high. The stems are very short and subterranean, flowers are blue or violet, rarely white and seeds are ovoid or pyriform, rugose, dark reddish-brown. Flowering in winter (Quezel and Santa, 1963). No uses in the folk medicine are known for this species. To the best of our knowledge, there is no information on the essential oils of *I. planifolia* and no studies of antioxidant and antimicrobial activities was performed for this specie.

This study aimed to characterize the essential oil profile and to determine the free radical scavenging assay and antimicrobial activity of oil and of different extracts (aqueous, ethanolic and dichloromethane) of *I. planifolia*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The whole of the plant were collected in January 2011 from a farm in Mansourah region, suburb west Tlemcen of Algeria. The plants collected were identified by Pr. Noury Benabadij, "Laboratory of Ecology and Ecosystem Management", University of Tlemcen (Algeria). A voucher specimen was deposited in this laboratory. Plant samples were dried in the shade and conserved for future use.

Essential oil

Dried plant materials were powdered (400 g) and subjected to hydro-distillation (in 4000 mL distilled water) for 4 h, using a Clevenger-type apparatus according to the method recommended in the European Pharmacopoeia (Council of Europe, 1996). The essential oil yields were 0.05% (w/w). The oils were dried over anhydrous sodium sulfate and then stored in sealed glass vials at 4

to 5°C prior to analysis.

Soxhlet extraction

The extraction of soluble compounds from *I. planifolia* by the soxhlet method was performed using water, ethanol and dichloromethane as solvents. The total extracting time was 2 h and the total amount of solvent was 150 ml maintained continuously refluxing over the sample (5 g). All assays were performed with water, ethanol and dichloromethane extracts. For the antimicrobial tests, the extracts were re-dissolved in the appropriate culture medium.

Phytochemical prospecting of the plant extracts

A small portion of the dry extracts was used for the phytochemical tests for compounds which include tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, triterpenoids and steroids in accordance with the methods of Harborne (1998); Gurinder and Daljit (2009).

Gas chromatography analysis (GC)

GC analyses were carried out using a Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and a fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed from 60 to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 ml/min); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (I) of the compounds were determined relative to the retention times of the series of n-alkanes (C5 to 30) with linear interpolation, using the Van den Dool and Kratz (2003) equation and software from Perkin-Elmer. Component relative concentrations were calculated based on GC peak areas without using correction factors.

Gas chromatography-Mass spectrometry analysis (GC-MS)

Samples were analyzed with a Perkin-Elmer Turbo mass detector (quadrupole), coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with the fused-silica capillary columns Rtx-1 (ion source temperature 150°C; energy ionization 70 eV). Electron-impact (EI) mass spectra were acquired over the mass range 35 to 350 Da (scan time: 1 s). Other GC conditions were the same as described under GC except split 1/80.

Component identification

Identification of individual components was based (i) on comparison of calculated RI, on polar and apolar columns, with those of authentic compounds or literature data (König et al., 2001; National Institute of Standards and Technology, 2008); and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries (Adams, 2001; König et al., 2001; National Institute of Standards and Technology, 1999) and comparison of mass spectra with those of our own library of authentic compounds or literature data (Adams, 2001; König et al., 2001).

Evaluation of antibacterial activity

Tests were performed on four bacteria reference strains obtained

Table 1. Phytochemical prospection of aqueous, ethanolic and dichloromethane extract of *I. planifolia*.

| Extract | Metabolites | | | | | | |
|-----------------|-------------|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Aqueous | + | + | - | + | - | + | - |
| Ethanol | + | + | - | - | - | + | - |
| Dichloromethane | - | - | - | + | + | - | - |

1: tannins; 2: flavonoids; 3: saponins; 4: triterpenoids; 5: steroids; 6: alkaloids; 7: coumarines, +: presence; -: absence.

from (Laboratoire Antibiotique, Anti-fungal: physical chemistry, synthesis and biological activity, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University of Tlemcen, 13000, Algeria). *Enterococcus faecalis* (ATCC 49452), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *K. pneumoniae* (ATCC 70063) and *S. typhimurium* (ATCC 13311). Two different techniques were used to test the antimicrobial activity: the paper disc diffusion and the dilution agar method. The MIC was determined by the later method.

Paper-disc diffusion method

Paper discs (6 mm in diameter) saturated with a 500 mg/ml solution of plant extract were applied to the surface of agar plates that were previously seeded by spreading of 0.1 ml overnight culture. The plates were incubated overnight at the appropriate temperature (see above) and the diameter of the resulting zone of inhibition was measured in millimeters. The results are indicated in Table 3 and the text represent the net zone of inhibition including the diameter (6 mm) of the paper disk. The scale of measurement was as follows (Barros et al., 2007) (disk diameter included): > 15 mm: very strong activity; < 15 to 12 mm: high activity; < 12 to 10 mm: average activity; 10 to 7 mm: low activity and < 7 mm: no activity. All the data collected for each assay are the averages of three determinations.

Dilution-agar method

A dilution agar method was used to determine the MIC. Stock solutions were obtained by dissolving extracts in dimethylsulfoxide (DMSO 1%). Serial dilutions were made to obtain concentrations ranging from 0 to 50 mg/ml of the extracts and essential oil. Each mixture was added to Mueller-Hinton agar (Cowan, 1999; Lennette and Balows, 1985).

The Petri dishes contained a sterile solution of DMSO and the culture medium, respectively, after incubation at 37°C for 24 h. The experiments were performed in triplicate.

2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) free radical scavenging activity

The hydrogen-donating abilities of the tested extracts were examined on the basis of the method described by Molyneux (2004) with some modifications. Used as reagent, DPPH obviously offers a convenient and accurate method for titrating the oxidizable groups of natural or synthetic antioxidants. About 1 ml of 90 µM DPPH solution of methanol was thoroughly mixed with an equal volume of test extracts at various concentrations (0.04 to 0.2 mg/ml) and kept in the dark for 60 min. Absorbance was read at 520 nm using methanol as blank. 1 ml of DPPH solution mixed with 1 ml of methanol was used as control. Inhibition of DPPH radical was calculated using the equation:

$$I (\%) = 100. (A_0 - A_s)/A_0$$

Where A_0 is the absorbance of the control (containing all reagents except the test compound) and A_s is the absorbance of the tested sample. The actual decrease in absorbance induced by the tested sample (change of colour from deep-violet to light yellow) was compared to that of the positive control trolox. The IC_{50} value represented the concentration of extract that causes 50% inhibition was determined. Experiments were carried out in triplicate and the mean value was recorded.

RESULTS

Phytochemical screening

From Table 1 it was observed that aqueous and ethanolic extract showed positive inference in the test for tannins, flavonoids and alkaloids. For saponins, the foam layer was showed only in aqueous extract. In triterpenoids test, dichloromethane extract showed positive result. It was also positive in steroids test. However coumarins test produced negative inference.

Essential oil composition

Table 2 shows the chemical composition of *I. planifolia* oil obtained by hydrodistillation with a Clevenger-type apparatus. 47 components were detected and 21 of them were identified by comparison with pure standards (RI and mass spectra matching); 17 compounds were identified by comparing their RI and mass spectra with literature data and commercial mass spectra library. For the other 9 compounds (0.5 to 2.7% of the total oil components) not enough information was found, and no possible attribution was proposed (unknown compounds). Nonetheless, no study has been so far performed on the volatile constituents of the Algeria *Iris* species. In this study, our objective was to determine composition of volatiles compounds of the *I. planifolia*.

The essential oil consists chiefly of alkanes (36.5%), acids (19.1%), ketones (11.7%), alcohols (9.0%), arylpropanoids (6.8%) and aldehydes (4.1%) accompanied by relatively much smaller amounts of monoterpenes (1.0%). Alkanes are present in a

Table 2. Essential oil composition of *I. planifolia*.

| N ^a | Components | I ₁ ^b | I _a ^c | % ^d | Identification ^e |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| 1 | Heptanal | 882 | 885 | 0.1 | RI, MS, Ref ₁ |
| 2 | Octanal | 981 | 973 | 0.3 | RI, MS, Ref ₁ |
| 3 | Nonanal | 1076 | 1088 | 0.1 | RI, MS |
| 4 | Hexadecanal | 1795 | 1789 | 0.6 | RI, MS |
| 5 | Octadecanal | 2017 | 2015 | 3.0 | RI, MS |
| | Σ of aldehyde compound | | | 4.1 | |
| 6 | Limonene | 1025 | 1028 | 0.2 | RI, MS |
| 7 | Linalool | 1086 | 1089 | 0.8 | RI, MS |
| | Σ of monoterpene compound | | | 1.0 | |
| 8 | 1,4-Dimethoxybenzene | 1030 | 1130 | 0.5 | RI, MS, Ref ₂ |
| 9 | Eugenol | 1331 | 1331 | 0.1 | RI, MS |
| 10 | Benzyl tiglate | 1498 | 1502 | 5.8 | RI, MS |
| 11 | Benzyl benzoate | 1730 | 1727 | 0.4 | RI, MS, Ref ₂ |
| | Σ of arylpropanoid compound | | | 6.8 | RI, MS, Ref ₂ |
| 12 | Dodecane | 1200 | 1200 | 0.5 | RI, MS |
| 13 | Tetradecane | 1400 | 1400 | 0.6 | RI, MS |
| 14 | Hexadecane | 1600 | 1600 | 0.2 | RI, MS |
| 15 | Heptadecane | 1700 | 1700 | 0.2 | RI, MS |
| 16 | Octadecane | 1800 | 1800 | 0.3 | RI, MS |
| 17 | Nonadecane | 1900 | 1900 | 0.3 | RI, MS |
| 18 | Eicosane | 2000 | 2000 | 2.7 | RI, MS |
| 19 | Heneicosane | 2100 | 2100 | 3.2 | RI, MS |
| 20 | Docosane | 2200 | 2200 | 1.9 | RI, MS |
| 21 | Tricosane | 2300 | 2300 | 7.7 | RI, MS |
| 22 | Tetracosane | 2400 | 2400 | 0.8 | RI, MS |
| 23 | Pentacosane | 2500 | 2500 | 16.7 | RI, MS |
| 24 | Hexacosane | 2600 | 2600 | 0.2 | RI, MS |
| 25 | Heptacosane | 2700 | 2700 | 1.1 | RI, MS |
| 26 | Octacosane | 2800 | 2800 | 0.1 | RI, MS |
| | Σ of alkane compound | | | 36.5 | |
| 27 | Tridecan-2-one | 1477 | 1470 | 2.9 | RI, MS |
| 28 | Phytone | 1833 | 1828 | 8.1 | RI, MS |
| 29 | Heptadecan-2-one | 1892 | 1895 | 0.7 | RI, MS |
| | Σ of ketone compound | | | 11.7 | |
| 30 | Tridecan-2-ol | 1490 | 1490 | 0.6 | RI, MS, Ref ₁ |
| 31 | Hexadecanol | 1872 | 1869 | 1.4 | RI, MS |
| 32 | Methyl heptadecanol | 2030 | 2035 | 0.5 | RI, MS |
| 33 | Octadecanol | 2078 | 2075 | 2.6 | RI, MS |
| 34 | (E)-Phytol | 2114 | 2107 | 2.9 | RI, MS |
| 35 | Eicosanol | 2273 | 2272 | 0.2 | RI, MS, Ref ₂ |
| 36 | Heneicosanol | 2365 | 2372 | 0.8 | RI, MS, Ref ₂ |
| | Σ of alcohol compound | | | 9.0 | |
| 37 | Dodecanoic acid | 1554 | 1557 | 0.6 | RI, MS, Ref ₂ |
| 38 | Hexadecanoic acid | 1962 | 1953 | 18.5 | RI, MS, Ref ₂ |

Table 2. Contd.

| | | | | |
|----|-----------------------|---|------|--------|
| | Σ of acid compound | | | 19.1 |
| 39 | Unknown | - | 1432 | 2.7 |
| 40 | Unknown | - | 1584 | 0.8 |
| 41 | Unknown | - | 1626 | 1.5 |
| 42 | Unknown | - | 1990 | 1.4 |
| 43 | Unknown | - | 2009 | 1.1 |
| 44 | Unknown | - | 2052 | 1.5 |
| 45 | Unknown | - | 2055 | 0.5 |
| 46 | Unknown | - | 2062 | 1.7 |
| 47 | Unknown | - | 2084 | 0.6 |
| | Σ of Unknown compound | | | 11.8 |
| | Total | | | 100.00 |

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1), ^b Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from König et al., 2001., ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa), ^d percentage, tr = trace (<0.05), e RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; Ref₁: compounds identified from literature data König et al., 2001., Ref₂: compounds identified from literature data NIST Chemistry WebBook.

significant amount (36.5%) with pentacosane as the major oil constituent (16.7%). It is accompanied by a noticeable amount of tricosane (7.7%), heneicosane (3.2%), eicosane (2.7%) and a much smaller amount of docosane, (1.9%) and heptacosane (1.1%). The ketone compounds are distinctly dominated by phytone (8.1%) while tridecan-2-one and heptadecan-2-one are detected in much lower amounts (2.9 and 0.7%, respectively). On the other hand, (E)-phytol, octadecanol and hexadecanol were the major components of alcoholic fraction of the plant oil (2.9, 2.6 and 1.4%, respectively). However, hexadecanoic acid (18.5%), benzyl tiglate (5.8%) and octadecanal were the major compounds of fraction of acids, arylpropanoids and aldehydes fraction, respectively.

Antibacterial activity

The antibacterial activities of the different extracts of *I. planifolia* that is, aqueous, ethanolic, dichloromethane and the essential oil were determined against pathogenic strains of gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and gram negative (*Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*) bacteria. The inhibition zone, measured in millimeters, including the diameter of the paper disk, was used as the criterion for measuring the antibacterial activity of *I. planifolia* extracts and essential oil. Table 3 shows that the tested extracts could be classified according to their activity. The strongly active extract of this plant was essential oil with an antimicrobial inhibition zone of 14 mm against *S. typhimurium* and *K. pneumoniae* and low activity against *S. aureus* and *E. faecalis* with an antimicrobial inhibition zone of 9 mm. The ethanolic extract had average activity against two food poisonous bacteria: *K. pneumoniae* and

S. aureus, with inhibition zone of 12 mm. However, aqueous and dichloromethane extract exhibited no effect of antibacterial activity against the bacterial pathogens tested.

Minimum inhibitory concentrations (MIC)

The most promising results were obtained from the essential oil and ethanolic extract, which did not only have the lowest MIC value (3.12 mg/ml against *S. typhimurium* and *K. pneumoniae*), but also inhibited the growth of *S. aureus* and *E. faecalis* with MIC values of 6.25 and 25 mg/ml, respectively. However, the aqueous and dichloromethane extract showed no inhibition towards any of the microorganisms assayed up to the value of 50 mg/ml.

Radical scavenging activity

In order to assess the radical scavenging potential of the essential oil and solvent extracts, the reactivity towards the stable free radical DPPH was measured. DPPH is one of the chemical compounds that possess a proton free radical and it shows a maximum absorption at 520 nm because of its bright purple colour. When DPPH encounters proton radical, its purple colour fades rapidly and this scavenging action forms the basic mechanism for measuring antioxidant activity. Table 4 demonstrates DPPH scavenging activity, expressed in percentage, caused by different concentrations of essential oil and solvent extracts from *I. planifolia*. The weakest radical scavenging activity was exhibited by the essential oil and ethanolic extract (50.03 and 53.66%, respectively), whereas the strongest activity was exhibited by the

Table 3. Antimicrobial activity of essential oil and solvent extracts (water, ethanol and dichloromethane) from *I. planifolia*.

| Species | Antimicrobial activity | | | | | | | |
|-------------------------|--|----------------------|------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|------------------|--------------------|
| | Disc diffusion assay (mm) ^a | | | | MIC (mg/ml) ^b | | | |
| | Gram-negative | | Gram-positive | | Gram-negative | | Gram-positive | |
| | <i>S. typhimurium</i> | <i>k. pneumoniae</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>S. typhimurium</i> | <i>k. pneumoniae</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. faecalis</i> |
| Aqueous extract | 7 | 6 | 6 | 6 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| Dichloromethane extract | 6 | 7 | 6 | 6 | >50 | >50 | >50 | >50 |
| Ethanol extract | 12 | 12 | 9 | 9 | 3.12 | 3.12 | 6.25 | 25 |
| Oil | 14 | 14 | 10 | 10 | 3.12 | 3.12 | 6.25 | 25 |

Table 4. DPPH radical-scavenging of essential oil and solvent extracts (water, ethanol and dichloromethane) from *I. planifolia* measured at different concentrations.

| Source | Concentrations (mg/ml) | | | | | |
|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | 0.2 | IC ₅₀ |
| Aqueous extract | 27.77 | 30.19 | 34.70 | 39.76 | 73.25 | 0.12 |
| Dichloromethane extract | 29.66 | 30.23 | 31.01 | 44.73 | 83.87 | 0.10 |
| Ethanol extract | 11.96 | 12.39 | 13.03 | 16.52 | 53.66 | 0.19 |
| Essential oil | 6.81 | 7.34 | 8.91 | 10.78 | 50.03 | 0.20 |
| Ascorbic acid | 39.40 | 51.03 | 68.57 | 97.84 | 98.36 | 0.048 |

dichloromethane and aqueous extract (83.87 and 73.25%, respectively) at a concentration of 0.2 mg/mL.

Therefore, DPPH scavenging activity is usually presented by the IC₅₀ value. Concentrations of the antioxidant providing 50% inhibition of DPPH in the test solution (IC₅₀) were calculated and presented in Table 4.

The dichloromethane extract of *I. planifolia* had the highest radical scavenging activity with the lowest IC₅₀ value of 0.1 mg/ml followed by the aqueous extract with an IC₅₀ value of 0.12 mg/ml. This was higher than the ethanol extract with an IC₅₀ value of 0.19 mg/ml and essential oil with an IC₅₀ value of 0.20 mg/ml.

DISCUSSION

Medicinal plants constitute an effective source of both traditional and modern medicines, herbal medicine has been shown to have genuine utility and about 80% of rural population depends on it as primary health care. The phytochemical analysis conducted on *I. planifolia* extracts revealed the presence of tannins, flavonoids, alkaloids, saponins and tannins which are known to have many biological activities such as antimicrobial (Djipa et al., 2000; Esquenazi et al., 2002) and antioxidant. The results of the study indicated that essential oil of *I. planifolia* exerted stronger antibacterial activity than solvent extracts.

Regarding to the composition of the essential oil of *I. planifolia*, various chemical compounds isolated by hydrodistillation have direct activity against many species of bacteria, such as terpenes and a variety of aliphatic hydrocarbons (alcohols, aldehydes and ketones). The lipophilic character of their hydrocarbon skeleton and the hydrophilic character of their functional groups are of main importance in the antimicrobial action of essential oils components. Therefore, a rank of activity has been proposed as follows: phenols>aldehydes>ketones>alcohols>esters>hydrocarbons (Kalemba and Kunicka, 2003). For example, some essential oils containing phenolic structures are highly active against a broad spectrum

of micro-organisms (Kalemba and Kunicka, 2003; Güllüce et al., 2003). The importance of the hydroxyl group has been confirmed (Dorman and Deans, 2000; Lawrence, 1993) and the relative position of the hydroxyl group on the phenolic ring does not appear to strongly influence the degree of antibacterial activity. Aldehydes are known to possess powerful antimicrobial activity. It has been proposed that an aldehyde group conjugated to a carbon to carbon double bond is a highly electronegative arrangement, which may explain their activity (Raja et al., 2011), suggesting an increase in electronegativity increases the antibacterial activity (Kurita et al., 1981). Terpenes have also shown antimicrobial properties that appear to have strong to moderate antibacterial activity against gram positive bacteria and against pathogenic fungi, but in general weaker activity was observed against gram-negative bacteria (Hada et al., 2003; Tepe et al., 2004).

Regarding free radical scavenging activity it was observed that the aqueous and dichloromethane extract of *I. planifolia* showed a significant dose dependent inhibition of DPPH radical scavenging activity compared to essential oil and ethanol extract. These extracts exhibited a noticeable antioxidant effect at low concentrations (Table 4). This suggests that extracts contain compounds that are capable of donating hydrogen to a free radical in order to remove odd electron which is responsible for radical's reactivity. According to these results, there is a relationship between chemical composition and antioxidant activity. Moreover, as reported in literature data, the antioxidant activity of essential oil could be attributed to phenolic compounds, flavonoids and saponins. The polyphenol compounds play a wide range of biological effects including antibacterial, anti-inflammatory, antiallergic, hepatoprotective, antithrombotic, antiviral, anticarcinogenic and cardioprotective and vasodilatory effects (Wong et al., 2006). These functions have been attributed to their antioxidant activity by several mechanisms such as free radical scavengers, reducing agents, complexers of pro-oxidant metals, quenchers of the formation of singlet oxygen and stimulating the antioxidative defence enzymes activities (Zhou and Yu, 2004).

These mechanisms will be led by two types of reactions: hydrogen atom transfer and single electron transfer (Huang et al., 2005). Flavonoids have been shown to exhibit their actions through effects on membrane permeability and by inhibition of membrane-bound enzymes such as the ATPase and phospholipase A2 (Surabhi and Leelavathi, 2010), and this property may explain the mechanisms of antioxidative action of *I. planifolia*. However, previous studies showed that the saponin fraction and single saponin such as 2- phenyl-benzopyrane have antioxidant activities (Rodrigues et al., 2005; Yalinkilic and Enginar, 2008).

In conclusion, essential oil and solvent extracts exhibited different range of free radical scavenging therefore, further tests should be conducted to confirm antioxidant activity. The obtained results may provide a

support to utilize the plants as new potential sources of natural additives for the food and/or pharmaceutical industries.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express thanks to Laboratoire antibiotique, anti-fungal: physical chemistry, synthesis and biological activity, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University of Tlemcen, 13000, Algeria) for bacteria strains.

REFERENCES

- Adams RP (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing. Carol Stream, IL, USA.
- Allali H, Benmehdi H, Dib MA, Tabti B, Ghalem S, Benabadi N (2008). Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian J. Chem.*, 20(4): 2701-2710.
- Atta-ur-Rahman SN, Baig I, Jalil S, Orhan I, Sener B, Choudhary MI (2003). Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *J. Ethnopharmacol.*, 86: 177-180.
- Baker JC, Owens RA, Whitaker BD, Mock NM, Roberts DP, Deahl KL, Aver'yanov AA (2010). Effect of viroid infection on the dynamics of phenolic metabolites in the apoplast of tomato leaves. *Physiol. Mol. Plant Pat.*, 74: 214-220.
- Barros L, Calhella RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, Estevinho LM (2007a). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur. Food Res. Technol.*, 225(2): 151-156.
- Belouahem-Abed D, Belouahem F, Bélair G (2009). Floristic biodiversity and vulnerability of Numidia Aulnaies glutinosa Algeria (NE Algeria). *Eur. J. Sci Res.*, 32(3): 329-361.
- Choudhary MI, Nur-e-Alam M, Akhtar F, Ahmad S, Baig I, Ondogh P, Gombosurengyin P, Atta-ur-Rahman SN (2001). Five new peltogynoids from underground parts of *Iris bungei*: a Mongolian medicinal plant. *Chem. Pharm. Bull.*, 49: 1295-1298.
- Cornelia Schütz M, Quitschau MH, Olivier P (2011). Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC-PDA-MS analysis. *Fitoterapia*, 82: 1021-1026.
- Council of Europe (1996). Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A (Ed.), Sainte Ruffine, France.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564-582.
- Djipa CD, Delmee M, Quentin-Leclercq J (2000). Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 71: 307-313.
- Dorman HJD, Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308-316.
- Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MMFS, Rodrigues HM, Tostes JBF, Rozenta IS (2002). Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res. Microbiol.*, 53: 647-652.
- Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, Agar G, Özkan H, Kartal N, Polissiou M, Sökmen A, Sahin F (2003). In-vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.*, 51(14): 3958-3965.
- Gurinder JK, Daljit SA (2009). Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *Compl. Alter. Med.*, 9: 30. doi:10.1186/1472-6882-9-30.
- Hada T, Shiraishi A, Furuse S, Inoue Y, Hamashima H, Masuda K, Shiojima K, Shimada J (2003). Inhibitory effects of terpene on the

[PT2] *Daucus carota* L. :

Nawel MELIANI; Mohammed El Amine DIB; Amel BENDIABDELLAH, Nassim DJABOU; Ilyas CHIKHI; Hocine ALLALI; Boufeldja TABTI

“Evaluation of antioxidant activity of essential oil and extracts from Algerian *Daucus carota* L. aerial parts”, *The Global Journal of Pharmaceutical Research*, 10 December 2012, Vol.1 (5), 1121-1129.



Evaluation of antioxidant activity of essential oil and extracts from Algerian *Daucus carota* L. aerial parts

N. Meliani*, M.A. Dib, A. Bendiabdellah, N. Djabou, I. Chikhi, H. Allali, B. Tabti

Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaid BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.

Corresponding Address: a_dibdz@yahoo.fr

Accepted 1st Sep, 2012



This study is designed to examine the chemical composition of essential oil of aerial parts of *Daucus carota ssp. carota* from Algeria and tested for their antioxidant activities. The hydrodistilled essential oil obtained from the aerial parts of *Daucus carota* L. ssp. *carota* have been analysed by GC and GC-MS. Analysis of the essential oils of stems and leaves, and umbels of *D. carota* ssp. *carota* showed the exclusive presence of terpenes with a high percentage of monoterpenes (91.8 and 63.1% respectively) much more abundant than phenylpropanoids (0.2 and 13.7% respectively). Plant phenolics constitute one of the major groups of components that act as primary antioxidant free radical terminators. The amounts of total phenolics and flavonoids in the solvent extracts were determined spectrometrically. Furthermore, the antioxidant activities of the essential oil and extracts were determined using a DPPH test system. Finally, a relationship was observed between the antioxidant activity potential and total phenolic and flavonoid levels of the extract.

KEYWORDS: *Daucus carota ssp. carota*; Essential oil; Solvent extract; Antioxidant activity; Chemical composition.

INTRODUCTION

Many natural compounds isolated from plants have been found to have significant pharmacological activities, with great potential for further development as drugs or drug analogs for human disease control. The consumption of natural antioxidant phytochemicals was reported to have potential health benefits¹⁻³. In recent years, there has been a considerable interest in finding natural antioxidants from plant materials. The antioxidant phytochemicals from plants, particularly essential oil components, flavonoids, and other polyphenols, have been reported to inhibit the propagation of free radical reactions, to protect the human

body from disease^{4, 5} and to retard lipid oxidative rancidity⁶. In addition, the use of synthetic antioxidants has been questioned because of their toxicity⁷. Therefore, there have been numerous researchers on these bioresources to seek for potential natural and possibly economic and effective antioxidants to replace the synthetic ones. Numerous studies exhibited a strong relationship between total phenolic content and antioxidant activity in fruits, vegetables, and medicinal plants^{8,9}. Flavonoid constituents possess a wide spectrum of chemical and biological activities, including radical scavenging properties¹⁰. *Daucus* is a worldwide genus of herbaceous plants of the family

Apiaceae of which the best-known species is the cultivated carrot. The genus comprises about 20 species divided into five sections¹¹. The genus *Daucus* L. appears to have its center of dispersion in the Mediterranean Region, particularly in North Africa, where strong speciation has taken place. Except the common carrot *D. carota* L., which is cultivated throughout the world, there is one Australian species, naturalized also in Europe and three other species in the American continent; all others are Mediterranean species¹¹. *Daucus carota* has been subject to several investigations¹²⁻²⁶. The aim of this work is to evaluate the antioxidative properties of the essential oil and extracts of *D. carota* ssp *carota*. Additionally, the total phenolic and flavonoid contents of methanol and water extracts and the chemical composition of the essential oil have been determined.

Experimental

Plant material

The aerial parts separated organs (stems and leaves on the one hand and umbels on the other hand) of *D. carota* ssp *carota* were harvested from Bensekrane forest area (at about 30 km north west of Tlemcen-Algeria) in July, 2009. The plant collected was identified by Pr. Noury Benabadji, "Laboratory of Ecology and Ecosystem Management", University of Tlemcen (Algeria). A voucher specimen was deposited in this laboratory. A portion of each organ was stored at 4°C for eventual further studies.

Essential oil extraction

Daucus essential oils were isolated by hydrodistillation (400-450 g of plant per sample) for 6 h using a Clevenger-type apparatus²⁷ according to the European Pharmacopoeia.

Preparation of the extracts

The air-dried sample (leaves/stems) (20 g) was extracted by using a Soxhlet extractor for 5 h, containing methanol under reflux conditions (250 mL). The residue was then extracted by boiling water (300 mL). Solvent was removed with a rotary evaporator to obtain the extract in the yield of 5.3% (w/w). The water extract was dried in a freeze-drier to obtain the extract in a yield of 9.8% (w/w).

Gas chromatography analysis

GC analyses were carried out using a Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and a fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Samples were injected in the split mode (1/50), using helium as the carrier gas (1 ml/min); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (I) of the compounds were determined relative to the retention times of the series of n-alkanes (C₅-C₃₀) with linear interpolation, using the Van den Dool and Kratz equation and software from Perkin-Elmer. Relative amounts of individual components were calculated on the basis of their GC peak areas on the two capillary Rtx-1 and Rtx-Wax columns, without FID response factor correction.

Gas Chromatography-Mass spectrometry analysis

Samples were analyzed with a Perkin-Elmer Turbo mass detector (quadrupole), coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL, equipped with the fused-silica capillary columns Rtx-1 and Rtx-

Wax (ion source temperature 150°C; energy ionization 70 eV). EI mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da (scan time: 1s). Other GC conditions were the same as described under GC except split 1/80.

Component identification

Identification of the components was based (i) on the comparison of their GC retention indices (RI) on non polar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data²⁸, and (ii) on computer matching with commercial mass spectral libraries^{28, 29} and comparison of spectra with those of our personal library.

Determination of total phenolic contents

The concentration of phenolics in plant extracts was determined using spectrophotometric method³⁰. Methanolic solution of the extract in the concentration of 1 mg/ml was used in the analysis. The reaction mixture was prepared by mixing 0.5 ml of methanolic solution of extract, 2.5 ml of 10% Folin-Ciocalteu's reagent dissolved in water and 2.5 ml 7.5% NaHCO₃. Blank was concomitantly prepared, containing 0.5 ml methanol, 2.5 ml 10% Folin-Ciocalteu's reagent dissolved in water and 2.5 ml of 7.5% of NaHCO₃. The samples were thereafter incubated in a thermostat at 45 °C for 45 min. The absorbance was determined using spectrophotometer at $\lambda_{max} = 765$ nm. The samples were prepared in triplicate for each analysis and the mean value of absorbance was obtained. The same procedure was repeated for the standard solution of gallic acid and the calibration line was construed. Based on the measured absorbance, the concentration of phenolic compounds was read (mg/ml) from the calibration line; then the

content of phenolics in extracts was expressed in terms of gallic acid equivalent (mg of GA/g of extract).

Determination of total flavonoids contents

Total flavonoid contents were determined using the Dowd method as adapted by Quettier, (2000)³¹. One milliliter of 2% aluminium trichloride (AlCl₃) in methanol was mixed with the same volume of extracts (200 μ g). The absorption at 430 nm was measured after 10 min against a blank sample consisting of 1 mL methanol without AlCl₃. The concentrations of flavonoid compounds expressed as μ g quercetin equivalent per mg of extract were calculated according to the standard quercetin graph. All experiments were carried out in triplicate, and quercetin equivalent values were reported as $X \pm$ SD of triplicates.

Antioxidant activity

The free radical-scavenging activities of essential oil and solvent extracts were measured using DPPH as described by Hatano (1988)³². Used as reagent, DPPH (2, 2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) obviously offers a convenient and accurate method for titrating the oxidizable groups of natural or synthetic antioxidants. Fifty microliters of various concentrations of the essential oil and solvents extracts were added to 5 mL of a 0.005% (w/v) methanol solution of DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature the absorbance was read against a blank at 517 nm. Inhibition of the free radical, DPPH, in percent (I %) was calculated according to the formula:

$$I (\%) = 100. (A_0 - A_s)/A_0$$

Where. A₀ is the absorbance of the control (containing all reagents except the test compound), and A_s is the absorbance of the tested sample. The

actual decrease in absorbance induced by the tested sample (change of color from deep-violet to light yellow) was compared to that of the positive control ascorbic acid. The IC_{50} value represented the concentration of extract that causes 50% inhibition was determined. Experiments were carried out in triplicate and the mean value was recorded.

RESULTS AND DISCUSSION

Essential oil composition

GC and GC-MS analysis of *D. carota* essential oils allowed to identify 61 components, which accounted for more than 90 % of the total oils. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC-retention indices and mass spectra with those of our laboratory produced "Arômes" library, except one compound which was identified by comparison with spectral data and retention indices from the literature (see Table 1). The essential oil yields, calculated from fresh material, were 0.52 and 1.11%, for the stems/leaves and the umbels of *D. carota* ssp. *carota*, respectively. Analysis of the essential oil from the stems/leaves showed the exclusive presence of terpenes with a high percentage of monoterpenes (95.9%). The main components were monoterpenes such as α -pinene (26.0%), sabinene (14.0%), β -pinene (11.2%), limonene (13.0%), myrcene (10.0%), terpinene-4-ol (4.9%) and p-cymene (4.4%). The umbels essential oil consists chiefly of monoterpene hydrocarbons (54.9%) and phenylpropanoids (17.5%) accompanied by relatively much smaller amounts of oxygenated monoterpenes (8.2%), sesquiterpene hydrocarbons (6.4%) and oxygenated sesquiterpenes (3.0%). Phenylpropanoids are present in significant amounts (17.6%) with (E)-Methylisoeugenol as the second major constituent of oil (17.5%) after α -pinene

(20.1%) (Table 2). When comparing the composition oil of aerial parts of *D. carota* ssp. *carota* from Algeria, largely dominated by α -pinene, sabinene, β -pinene, limonene, myrcene and (E)-Methylisoeugenol with those reported in the literature, we noted some similarities and difference. The blooming-umbel oil of *D. carota* ssp. *carota* from Poland was mainly composed of monoterpene hydrocarbons (84%), and the major components were found to be α -pinene (41%) and sabinene (18%)¹⁹. The composition of the essential oil obtained from aerial parts at three stages of development, herb (without umbels), inflorescence in full bloom, and ripe umbels were dominated by monoterpene hydrocarbons with α -pinene (16-43%), sabinene (21-45%) and myrcene (4-13%) as major components¹⁵. The composition of the essential oil of *D. carota* ssp. *carota* from Lithuania belonged to the sabinene (26.8-60.6%) chemotype with other predominant compounds such as α -pinene (16-24%), α -terpinene (2.9-6.0%) and limonene (2.1-4%)²⁰. Leaf, stem, and umbel oils from Corsican *D. carota* collected before flowering or at full flowering stage contained mostly monoterpenes, namely α -pinene (28-39%) and sabinene (7-20%). Conversely, an oil sample isolated from umbels at the postflowering stage (umbels in nest containing seeds) was largely dominated by (E)-methylisoeugenol (41%) besides α -pinene (19%) and sabinene (10%)¹⁴.

Assays of total phenolics and flavonoids from solvent extracts

The amounts of total phenolics in the extracts were determined spectrometrically according to the Folin-Ciocalteu procedure and calculated as gallic acid equivalent. The amounts of total phenols found in the plant extracts are shown in Table 2. The total phenolics and contents of the methanol

and water extracts of *D. carota* ssp. *carota* were 164.99 ± 8 and 119.80 ± 14 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The results showed that the methanol extract has higher total phenol and flavonoid components than the water extract. Similarly, the methanol extract was found to be richer in flavonoids (85.72 ± 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$) than the water extract (48.27 ± 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

Antioxidant properties

The antioxidant activity of the essential oil and extracts was determined by the DPPH test system. Table 3 demonstrates DPPH scavenging activity, expressed in percentage, caused by different concentrations of essential oil and solvent extracts from *D. carota* ssp. *carota*. In this system, the synthetic antioxidant (97.84% at 0.08 mg/mL concentration) showed activity as strong as the solvent extracts and essential oil. The weakest radical scavenging activity (10.29%) was exhibited by the essential oil at a concentration of 4 mg/mL, whereas the strongest activity (69.82%) was exhibited by the methanol extract at a concentration of 0.1 mg/mL. The next highest activity (80.57%) was for the water extract at a concentration of 1.4mg/mL. As shown in Table 3, the antioxidant activity of extracts and essential oil also increased with an increase in their concentrations. At higher concentrations, the antioxidant activity of methanol extract was closer to the scavenging effect of ascorbic acid. Therefore, DPPH scavenging activity is usually presented by the IC_{50} value. Concentrations of the antioxidant providing 50% inhibition of DPPH in the test solution (IC_{50}) were calculated and presented in Table 3. The methanol extract of *D. carota* ssp. *carota* had the highest radical scavenging activity with the lowest IC_{50} value of 0.068 mg/mL. This was higher than the water extract with an IC_{50} value of 0.644 mg/mL and essential oil with an IC_{50} value of 40.97

mg/mL. The DPPH free radical is a stable free radical, which has been widely used as a tool to estimate the free radical-scavenging activity of antioxidants. Antioxidants, upon interaction with DPPH, either transfer electrons or hydrogen atoms to DPPH, thus neutralizing the free radical character³³. The key role of phenolic compounds as scavengers of free radicals is emphasized in several reports^{33,34}.

CONCLUSIONS

The solvent extracts and essential oil of *D. carota* ssp. *carota* were found to be effective antioxidants by in vitro assays. According to these results, there is a relationship between the total phenol content and antioxidant activity. Indeed, it is extremely important to point out that there is a positive correlation between the antioxidant activity potential and the amount of phenolic compounds in the extracts. Moreover, as reported in literature data [35], the antioxidant activity of extracts could be attributed to its relatively high content of the phenolic compounds. In addition, the components responsible for the antioxidant activities of the extracts were not identified and further work should be conducted to isolate and identify these bioactive compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Professor Jean COSTA, Director of Laboratory of Chemistry of Natural Products, University of Corse, France for providing facilities for this work.

REFERENCES

- 1) Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., Capasso, F., "Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs", Life Science, 65, 337-353, 1999.
- 2) Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto F., "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/

- antioxidant power assay", Journal of agricultural and food chemistry, 48, 3396-3402, 2000.
- 3) Sumino, M., Sekine, T., Ruangrungsi, N., Igarashi, K., Ikegami F., "Ardisiphenols and other antioxidant principles from the fruits of *Ardisia colorata*". Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 50, 1484-1487, 2002.
 - 4) Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J., "Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods", Food Technology, 47, 85-89, 1993.
 - 5) Terao, J., Piskula, M.K., Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. pp. 277-295. In: Flavonoids in Health and Disease. Rice-Evans CA, Packer L (eds). Marcel Dekker, New York, NY, USA, 1997.
 - 6) Duthie, G.G., "Lipid peroxidation. European Journal of Clinical Nutrition", 47, 759-764, 1993.
 - 7) Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos M., "Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid", Journal of agricultural and food chemistry, 50, 4989-4993, 2002.
 - 8) Dorman, H.J.D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R., "Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars", Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51, 4563-4569, 2003.
 - 9) Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetable and grain products", Journal of agricultural and food chemistry, 46, 4113-4117, 1998.
 - 10) Shimoi, K., Masuda, S., Shen, B., Furugori, B., Kinane, N., "Radioprotective effect of antioxidant plant flavonoids in mice", Mutation Research, 350, 153-161, 1996.
 - 11) Sáenz Laín, C., "Research on *Daucus* L. (Umbelliferae)", Anales Jard. Bot. Madrid, 37, (2), 480-533, 1981.
 - 12) Flamini, G., Cioni, P.L., Maccioni, S., Baldini, R., "Composition of the essential oil of *Daucus gingidium* L. ssp. *gingidium*", Food Chem, 103, 1237-1240, 2003.
 - 13) Dib, M.A., Djabou, N., Desjobert, J.M., Allali, H., Tabti, B., Muselli, A., Costa, J., « Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation", Chem Central J, 4,16, 2010.
 - 14) Gonny, M., Bradesi, P., Casanova, J., "Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy". Flavour Fragrance Journal, 19, 424-433, 2004.
 - 15) Góra, J., Lis, A., Kula, J., Staniszevska, M., Wołoszyn, A., "Chemical composition variability of essential oils in the ontogenesis of some plants", Flavour Fragrance Journal, 445, 2002.
 - 16) Saad, H.E.A., ElSharkawy, S.H., Halim, A.F., "Essential oils of *Daucus carota* ssp. *maximus*", Pharmaceutica Acta Helvetiae, 70, 79-84, 1995.
 - 17) Mazzoni, V., Tomi, F., Casanova J., "A daucane-type sesquiterpene from *Daucus carota* seed oil", Flavour Fragrance Journal, 14, 268-272, 1999.
 - 18) Mockute, D., Nivinskiene, O., "The sabinene chemotype of essential oil of seeds of *Daucus carota* L. ssp. *carota* growing wild in Lithuania", Journal of Essential Oil Research, 16, 277-281, 2004.
 - 19) Staniszevska, M., Kula, J., Wieczorkiewicz, M., Kusewicz, D., "Essential oils of wild and cultivated carrots-the chemical composition and antimicrobial activity", Journal of Essential Oil Research, 17, 579-583, 2005.
 - 20) Kula, J., Izydorczyk, K., Czajkowska, A., Bonikowski, R., "Chemical composition of carrot umbells oils from *Daucus carota* ssp. *sativus* cultivated in Poland", Flavour Fragrance Journal, 21, 667-669, 2006.
 - 21) Wu, Y., Xu, Z.L., Li, H.J., Meng, X.Y., Bao, Y.L., Li, Y.X., "Components of essential oils in different parts of *Daucus carota* L", Chemical Research Chinese University, 22 (3), 328-334, 2006.
 - 22) Rossi, P.G., Bao, L., Luciani, A., Panighi, J., Desjobert, J.M., Costa, J., Casanova, J., Bolla, J.M., Berti, L., "(E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oils against *Campylobacter jejuni*", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 7332-7336, 2007.
 - 23) Jabrane, A., Ben Jannet, H., Harzallah-Skhiri, F., Mastouri, M., Casanova, J., Mighri Z., "Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and ¹³C-NMR Spectroscopy, and in vitro Antibacterial Activity", Chemistry & Biodiversity, 6, 881-889, 2009.
 - 24) Lanfranchi, D.A., Laouer, H., El Kolli, M., Prado, S., Maulay-Bailly, C., Baldovini N. "Bioactive Phenylpropanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria", Journal of Agriculture and Food Chemistry, 58, 2174-2179, 2010.
 - 25) Radulovic, N., Đord-ević, N., Stojanovic-Radic, Z., "Volatiles of the Balkan endemic *Daucus guttatus* ssp. *zahariadii* and cultivated and wild-growing *D. carota* – A comparison study", Food Chemistry, 125, 35-43, 2011.

- 26) Smaili, T., Zellagui, A., Cioni, P.L., Guido, F., "A Myristicin-rich Essential Oil from *Daucus sahariensis* Growing in Algeria", Natural Product Communications, 6, 883-886, 2011.
- 27) Marzouki, H., Khaldi, A., Falconieri, D., Piras, A., Marongiu, B., Moliccotti, P., Zanetti, S., "Essential Oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction", Natural Product Communications, 5, 1955-1958, 2010.
- 28) Council of Europe, Pharmacopée Européenne, Maisonneuve S.A (Ed.), Sainte Ruffine, France, 1996.
- 29) König, W.A., Hochmuth, D.H., Joulain, D., Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of Mass Finder 2.1. Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, 2011.
- 30) Adams, R.P. Identification of essential oils by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, USA, 2001.
- 31) Slinkard, K., Singleton, V.L., "Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods", American Journal of Enology and Viticulture, 28, 49-55, 1977.
- 32) Quertier, D.C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M.C., Cayin, J.C., Bailleul, F. and TROTIN, F. (2000): Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. Journal of ethnopharmacology. 72: 35-42.
- 33) Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., "Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging affects", Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 36, 1090-2097, 1988.
- 34) Archana, B., Dasgupta N, De B., "In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit". Food Chemistry, 90, 727-733, 2005.
- 35) Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela P., "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds", International Journal of Food Microbiology, 56, 3-12, 2000.
- 36) Bellakhdar, J., La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Ibis press, 1997.

Table 1: Essential oils of aerial parts of *D. carota* ssp *carota* from Algeria

| N° | Components ^a | IRIa ^b | Ria ^c | Rip ^d | Leaf/stem ^e | Umbels ^e | Identification ^f |
|----|----------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 01 | Nonene | 883 | 879 | 930 | tr | tr | RI, MS |
| 02 | α-Thujene | 922 | 920 | 1019 | 0.9 | 0.3 | RI, MS |
| 03 | α-Pinene | 936 | 931 | 1016 | 26.0 | 20.1 | RI, MS |
| 04 | Camphene | 943 | 945 | 1062 | 1.8 | 1.8 | RI, MS |
| 05 | Thuja-2,4(10)-diene | 946 | 948 | 1117 | 0.2 | tr | RI, MS |
| 06 | Sabinene | 964 | 968 | 1117 | 14.0 | 14.5 | RI, MS |
| 07 | β-Pinene | 978 | 970 | 1102 | 11.2 | 5.6 | RI, MS |
| 08 | Myrcene | 987 | 980 | 1152 | 10.0 | 3.7 | RI, MS |
| 09 | α-Phellandrene | 997 | 999 | 1159 | 0.2 | 0.1 | RI, MS |
| 10 | 3-methyl butyl Isobutyrate | 1002 | 1002 | 1170 | 0.1 | tr | RI, MS |
| 11 | 2-methyl butyl Isobutyrate | 1004 | 1007 | 1170 | 01 | tr | RI, MS |
| 12 | α-Terpinene | 1008 | 1011 | 1267 | 0.9 | tr | RI, MS |
| 13 | p-Cymene | 1011 | 1015 | 1256 | 4.4 | 3.3 | RI, MS |
| 14 | Limonene | 1025 | 1022 | 1195 | 13.0 | 5.4 | RI, MS |
| 15 | (Z)-β-Ocimene | 1024 | 1027 | 1221 | 0.1 | - | RI, MS |
| 16 | (E)-β-Ocimene | 1034 | 1037 | 1237 | 0.2 | - | RI, MS |
| 17 | γ-Terpinene | 1047 | 1051 | 1233 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| 18 | Nonan-2-one | 1070 | 1073 | 1392 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| 19 | Terpinolene | 1078 | 1080 | 1274 | 0.2 | - | RI, MS |
| 20 | Linalool | 1082 | 1085 | 1392 | 0.8 | - | RI, MS |
| 21 | 2-methyl butyl Isovalerate | 1098 | 1090 | 1274 | 0.2 | 0.3 | RI, MS |
| 22 | α-Campholenal | 1105 | 1093 | 1470 | 0.2 | 0.2 | RI, MS |
| 23 | trans-Pinocarveol | 1125 | 1124 | 1648 | 0.3 | 0.7 | RI, MS |
| 24 | Pinocarvone | 1136 | 1130 | 1547 | 0.3 | 1.3 | RI, MS |
| 25 | Cryptone | 1157 | 1158 | 1658 | 0.1 | 0.3 | RI, MS |
| 26 | Terpinene-4-ol | 1161 | 1165 | 1586 | 4.9 | 2.4 | RI, MS |
| 27 | Myrtenal | 1172 | 1171 | 1619 | 0.2 | 0.1 | RI, MS |
| 28 | α-Terpineol | 1176 | 1177 | 1685 | 0.3 | 0.1 | RI, MS |
| 29 | Verbenone | 1184 | 1182 | 1694 | 0.1 | 0.7 | RI, MS |

| | | | | | | | |
|------------------------------------|------------------------------|------|------|------|-------------|-------------|--------------|
| 30 | Carvone | 1214 | 1216 | 1749 | 0.1 | 0.2 | RI, MS |
| 31 | Cuminaldehyde | 1217 | 1213 | 1778 | 0.2 | 0.2 | RI, MS |
| 32 | Bornyl acetate | 1269 | 1270 | 1515 | 1.0 | 1.8 | RI, MS |
| 33 | α -Terpenyl acetate | 1334 | 1333 | 1676 | tr | 0.1 | RI, MS |
| 34 | Geranyl acetate | 1362 | 1360 | 1749 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| 35 | α -Ylangene | 1375 | 1374 | 1470 | 0.1 | 0.2 | RI, MS |
| 36 | α -Copaene | 1379 | 1371 | 1457 | 0.1 | 0.3 | RI, MS |
| 37 | α -Cedrene | 1417 | 1410 | 1563 | - | 0.2 | RI, MS |
| 38 | (E)-Caryophyllene | 1424 | 1426 | 1592 | 0.4 | 1.1 | RI, MS |
| 39 | trans- α -Bergamotene | 1432 | 1431 | 1573 | 0.1 | 0.4 | RI, MS |
| 40 | α -Sesquibabinene | 1435 | 1435 | 1637 | 0.1 | 1.2 | RI, MS |
| 41 | (E)- β -Farnesene | 1448 | 1449 | 1659 | 0.2 | 1.3 | RI, MS |
| 42 | (E)-Methylisoeugenol | 1465 | 1463 | 2170 | 0.1 | 17.4 | RI, MS |
| 43 | γ -muurolene | 1473 | 1471 | 1667 | 0.1 | 0.2 | RI, MS |
| 44 | Germacrene D | 1480 | 1483 | 1663 | tr | 0.2 | RI, MS |
| 45 | γ -Humulene | 1483 | 1487 | 1682 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| 46 | Bicyclogermacrene | 1494 | 1499 | 1683 | tr | 0.1 | RI, MS |
| 47 | β -Bisabolene | 1500 | 1494 | 1720 | 0.1 | 0.2 | RI, MS |
| 48 | Cuparene | 1504 | 1500 | 1824 | tr | 0.6 | RI, MS |
| 49 | δ -Cadinene | 1515 | 1519 | 1762 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| 50 | Elemicin | 1518 | 1527 | 2232 | 0.1 | 0.1 | RI, MS, Ref1 |
| 51 | E- α -Bisabolene | 1531 | 1526 | 1733 | tr | 0.2 | RI, MS |
| 53 | 1,5 epoxy-Salvial-4(14)ene | 1561 | 1563 | 1912 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| 54 | Spathulenol | 1572 | 1568 | 2095 | 0.8 | 0.2 | RI, MS |
| 55 | Caryophyllene oxyde | 1576 | 1574 | 1937 | 0.8 | 0.3 | RI, MS |
| 56 | Copaborneol | 1592 | 1588 | 2154 | tr | 0.1 | RI, MS |
| 57 | Humulene epoxyde II | 1601 | 1595 | 2009 | 0.1 | 0.1 | RI, MS |
| 58 | T-Muurolol | 1634 | 1624 | 2138 | 0.1 | 0.4 | RI, MS |
| 59 | α -Cadinol | 1645 | 1638 | 2227 | 0.1 | 0.7 | RI, MS |
| 60 | (Z)- α -Santalol | 1669 | 1667 | 2306 | - | 0.3 | RI, MS |
| 61 | (E,Z)-Farnesol | 1685 | 1680 | 2313 | - | 0.8 | RI, MS |
| Total identification % | | | | | 95.9 | 90.4 | |
| Essential oil yield % (w/w) | | | | | 0.52 | 1.11 | |
| Monoterpene hydrocarbons | | | | | 83.2 | 54.9 | |
| Oxygenated monoterpenes | | | | | 8.6 | 8.2 | |
| Sesquiterpene hydrocarbons | | | | | 1.4 | 6.4 | |
| Oxygenated sesquiterpenes | | | | | 2.0 | 3.0 | |
| Phenylpropanoids | | | | | 0.2 | 17.5 | |
| Non-terpenic compounds | | | | | 0.5 | 0.4 | |
| Hydrocarbon compounds | | | | | 84.6 | 61.3 | |
| Oxygenated compounds | | | | | 11.3 | 29.1 | |

a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1), b Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from König et al., 2001., c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa), d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp), e Percentages are given on the apolar column except for components with identical RIa (percentages are given on the polar column), tr = trace (<0005 %), f RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; Ref1.: compounds identified from literature data König et al., 2001.

Table 2: Total phenol and flavonoid contents of *D. carota* ssp. *carota* solvent extracts

| Solvent extract | Total polyphenol content ($\mu\text{g GA/mg extract}$) | Total flavonoid content |
|-----------------|--|-------------------------|
| Methanol | 164.99 \pm 6 | 85.72 \pm 4 |
| Water | 119.80 \pm 18 | 48.27 \pm 2 |

Values expressed are means \pm SD of three parallel measurements.

Table 3: DPPH radical-scavenging of essential oil and solvent extracts (water and methanol) from *D. carota* ssp. *carota* at different concentrations.

| Sample | Antioxidant activities | 4 | 12 | 24 | 48 |
|---------------|---|-------|-------|-------|-------|
| Essential oil | Essential oil (umbels) concentration (mg/mL). | | | | |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 10.29 | 18.32 | 31.92 | 56.79 |
| | DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | | | | 40.97 |
| Water | Extract concentration (mg/mL) | 0.01 | 0.02 | 0.70 | 1.4 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 20.54 | 26.47 | 53.80 | 80.56 |
| | DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | | | | 0.644 |
| Methanol | Extract concentration (mg/mL) | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.1 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 35.08 | 46.00 | 57.74 | 69.82 |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | 0.068 |
| Ascorbic acid | Extract concentration (mg/mL) | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 39.40 | 51.03 | 68.57 | 97.84 |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | 0.048 |

[PT3] *Phagnalon sordidum* L. et *Phagnalon saxatile*

Ilyas CHIKHI; Hocine ALLALI; Mohammed El Amine DIB; Djamila MERGHACHE;
Houria MEDJDOUB; Boufeldja TABTI.

“Antioxidant activities and phytochemical study of extracts of two phagnalons species growing in Algeria”, *International Journal of Traditional and Herbal Medicine (IJTHM)*, Vol. 1(3), 2013, pp. 49-53

Antioxidant activities and phytochemical study of extracts of two *phagnalons* species growing in Algeria

Ilyas Chikhi¹, Hocine Allali¹, Mohammed El Amine Dib^{1,*}, Djamila Merghache², Houria medjdoub¹, Boufeldja Tabti¹

- 1- Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd BP 119, Tlemcen 13000, Algérie.
2- Antibiotic and Antifungal Physico-Chemistry, Synthesis and Biological Activity, Faculty of Sciences of the Nature and the Life, University of Aboubekr Belkaïd, P. O. Box 119, Tlemcen 13000, Algeria.

*Corresponding Author: Mohammed El Amine Dib

Abstract

The presence of natural antioxidant in plants is well known. Plant phenolics constitute one of the major groups of components that act as primary antioxidant free radical terminators. The antioxidant properties of aerial parts of two species of *phagnalons*, *phagnalon saxatile* and *phagnalon sordidum* were investigated. The amounts of total phenolics and flavonoids in the ethanolic extract were determined spectrometrically. From the analyses, the ethanolic extract of *p. saxatile* had the highest total phenolic content and highest antioxidant activity, using DPPH and ferric reducing antioxidant power methods. Finally, a relationship was observed between the antioxidant activity potential and total phenolic and flavonoid levels of the extract. These results demonstrate that ethanolic extract and their derived phytochemicals of *phagnalons* aerial parts have excellent antioxidant activities and thus they have great potential as sources for natural health products.

Keywords: Antioxidant activity; Ethanolic extract; Phytochemical screening; *P. saxatile*; *P. sordidum*.

Introduction

Among the various medicinal and culinary plants, some indigenous species contain a wide variety of free radical scavenging molecules, such as flavonoids, anthocyanins, carotenoids dietary glutathione, alkaloids, tannins, saponins, steroids, terpenoids and rotenoids which are rich in antioxidant activities (Pham-Huy LA and Pham-Huy, 2008). Therefore, the intake of natural antioxidants from plants has been associated with low incidence of cancer, cardiovascular -disease, diabetes, and other diseases associated with aging (Kuo, 1997). Several studies had been conducted to evaluate the correlation between phenolic compounds and antioxidant activity (Yen and Hsieh, 1998; Gülçin et al., 2003). The antioxidative properties of some vegetables and fruits are partly due to the phenolic compounds (Wang et al., 1999). Phenolic compounds are the main agents that can donate hydrogen to free radicals and thus break the chain reaction of lipid oxidation at the first initiation step (Agrawal, 1989). This high potential of phenolic compounds to scavenge radicals may be explained by their phenolic hydroxyl groups (Havsteen, 2002). *Phagnalon* species have an immense medicinal importance and are used in folk medicine in decoctions as antiallergic, anti-inflammatory and for the treatment of asthma and headache (Ali-Shtayeh and Yaghmour, 1998; Conforti and Rigano, 2010). Many reports have shown that *Phagnalon* species possesses biological properties: hypertensive effects, anti-oxidative properties, Anticholinesterase properties, antimicrobial activity (Ali-Shtayeh and Yaghmour, 1998; Conforti and Rigano, 2010; Hausen and Schulz, 1977). However, to the best of our knowledge there is no prior report on phytochemicals and antioxidant activities of aerial parts extract of *P. saxatile*; *P. sordidum* from Algeria. The aim of this work is to evaluate the antioxidative properties of the ethanolic extract of *P.*

saxatile; *P. sordidum*. Additionally, the total phenolic, flavonoid contents and phytochemical screening of ethanolic extract have been determined.

Materials and Methods

Plant Material

Aerial parts of both *Phagnalon* were collected at the flowering stage in May 2012. The plant material was botanically identified by Pr. Noury Benabadi (Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of University of Tlemcen Algeria). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen.

Preparation of ethanolic extract

The air-dried sample (20 g) was extracted by using a Soxhlet extractor for 5 h, containing ethanol under reflux conditions (250 mL). Solvent was removed with a rotary evaporator to obtain the extract with the yield of 33.5 % for *p. sordidum* and 38.2 % for *p. saxatile* (w/w).

Phytochemical prospecting

The phytochemical tests to detect the presence of alkaloids, tannins, saponins, flavonoids, steroids, anthracenosides and coumarins were performed according to the method described by Kokate, (1994) and Harborne, (1998). The tests were based on the visual observation of color change or formation of a precipitate after the addition of specific reagents.

Determination of total phenolic contents

Total phenolic contents of the extracts were determined using Folin– Ciocalteu reagent according to the method previously reported by Slinkard and Singleton, (1977) using gallic acid as a standard, and as modified by Li et al., (2008). 200 µL of the dilute extract solution containing 40 µg of the extract was added to 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted in distilled water). After 4 min, 800 µL of Na₂CO₃ (75 mg/mL) solution was added and the mixture was allowed to stand for 45 min at room temperature. At the end of the incubation, the absorbance was measured at 760 nm with a spectrophotometer (Optizen POP spectrophotometer, Daejeon, South Korea).

The same procedure was also applied to the standard solutions of gallic acid, and a standard curve was obtained. The concentrations of phenolic compounds expressed as mg gallic acid equivalent per g (mg GE/g) of extract were calculated according to the standard gallic acid graph. All experiments were carried out in triplicate, and gallic acid equivalent values were reported as X ± SD of triplicates.

Determination of total flavonoids contents

Total flavonoid contents of the extracts were determined using the Dowd method as adapted by Arvouet-Grand et al., (1994). One milliliter of 2% aluminium trichloride (AlCl₃) in methanol was mixed with the same volume of extracts (200 µg). The absorption at 430 nm was measured after 10 min against a blank sample consisting of 1 mL methanol without AlCl₃. The concentrations of flavonoid compounds expressed as mg quercetin equivalent per g (mg QE/g) of extract were calculated according to the standard quercetin graph. All experiments were carried out in triplicate, and quercetin equivalent values were reported as X ± SD of triplicates.

Determination of antioxidant activity

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity

The antioxidant activity of the samples was determined by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging (Hatano et al. 1988). In test tubes, 0.25 ml of DPPH 0.8 mM in MeOH was added to accurately weighed aliquots of the extracts dissolved in 3.75 mL of MeOH, corresponding to concentration ranges of extract between 0.01 to 0.2 mg/mL. After mixing, the samples were maintained in the dark, at room temperature for 30 min. The absorbance at 517 nm was measured using a UV/Vis V-530 spectrophotometer and compared with a control without extract. A blank was prepared for each sample using methanol instead of the DPPH solution. Ascorbic acid was used as reference compound. Antioxidant activity was expressed as a percent inhibition of DPPH radical, and calculated from the equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100 [(\text{Abs control} - \text{Abs sample})/\text{Abs control}]$$

IC₅₀ values were determined from the plotted graphs of scavenging activity against the concentration of the extracts. These values are defined as inhibitory concentration of the extract necessary to decrease the

initial DPPH radical concentration by 50% and are expressed in mg/ml. Triplicate measurements were carried out.

Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

The total antioxidant capacity of sample was determined using a FRAP assay of Oyaizu, (1986). Different concentrations of extracts (0.10 and 0.15 mg/mL) in distilled water were mixed with 2.5 mL of phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 2.5 mL of potassium.

Results and Discussion

Phytochemical prospecting

The phytochemical analysis conducted on *P. sordidum* and *P. saxatile* ethanolic extract revealed the presence of tannins, saponins, flavonoids and terpenes (Table 1). Through of this phytochemical prospecting, it was possible to determine the presence of diverse classes of secondary metabolites that show a wide variety of biological activities, such as polyphenols and flavonoids, that are known to be useful in the treatment of inflamed or ulcerated tissues and that have remarkable activity anticancer and in cancer prevention (Barreiros and David, 2006; Okuda et al., 1989).

Assays of total phenolics and flavonoids from ethanolic extract

The amounts of total phenolics in the ethanolic extract were determined spectrometrically according to the Folin–Ciocalteu procedure and calculated as gallic acid equivalent (Table 2). The results showed that the extract of *P. saxatile* has higher total phenol components than the *P. sordidum* extract. The total phenolics and contents of the ethanolic extract of *P. saxatile* and *P. sordidum* were 32.72 ± 0.3 and $39.51 \pm 0.2 \mu\text{g GA/mg extract}$ respectively. Similarly, the extract of *P. saxatile* was found to be richer in flavonoids ($19.77 \pm 0.6 \mu\text{g GA/mg extract}$) than the *P. sordidum* extract ($16.52 \pm 0.4 \mu\text{g GA/mg extract}$).

Antioxidant properties

A comparative study of antioxidant activity on two *Phagnalon* species growing in Algeria was carried out in this study. Antioxidant properties were determined following two established methods like DPPH free radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power. Table 3 demonstrates DPPH scavenging activity, expressed in percentage, caused by different concentrations of ethanolic extract from *P. sordidum* and *P. saxatile*. The weakest radical scavenging activity (85.11 %) was exhibited by the ethanolic extract of *P. sordidum* at a concentration of 6 mg/mL, whereas the strongest activity (89.12 %) was exhibited by the ethanolic extract of *P. saxatile* at a concentration of 0.3 mg/mL. In this system, the acid ascorbic showed activity as strong as the ethanolic extracts (Table 3). Therefore, DPPH scavenging activity is usually presented by the IC₅₀ value. Concentrations of the antioxidant providing 50% inhibition of DPPH in the test solution (IC₅₀) were calculated and presented in Table 3. The ethanolic extract of *P. saxatile* had the highest radical scavenging activity with the lowest IC₅₀ value of 0.068 mg/mL. This was higher than the *P. sordidum* ethanolic extract with an IC₅₀ value of 0.93 mg/mL. Figure 1 is showing the results of reducing power activity of ethanolic extract of *P. sordidum* and *P. saxatile*. Both extracts showed the presence the reductive effects, which increased with an increase in concentration. However, ethanolic extract of *P. saxatile* exhibited relatively high reducing power than ethanolic extract of *P. sordidum*. This good antioxidant activity is attributed to the presence of natural antioxidants such as tannins, flavonoids, saponins and terpenes. Flavonoids have been shown to exhibit their actions through effects on membrane permeability, and by inhibition of membrane-bound enzymes such as the ATPase and phospholipase A2 (Li et al., 2008). Tannins were also shown to be able to remove reactive species by the DCFH-DA method, reducing oxidative stress, lipid peroxidation and damage to proteins. These properties may explain the mechanisms of antioxidative action of these both plants. Other hand, it is extremely important to point out that there is a positive correlation between the antioxidant activity potential and the amount of phenolic compounds in the extracts. Moreover, as reported in literature data (Bellakhdar, 1997), the antioxidant activity of extracts could be attributed to its relatively high content of the phenolic compounds.

Table 1. Phytochemical prospecting of ethanolic extract of *P. sordidum* and *P. saxatile* aerial parts

| Phagnalons | Metabolites | | | | | | |
|-----------------|-------------|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>sordidum</i> | + | + | + | - | - | + | - |
| <i>saxatile</i> | + | + | + | - | - | + | - |

1: Tannins; 2: Flavonoids; 3: saponins; 4: Coumarins; 5: Alkaloids; 6: Terpenes; 7: Steroids. + : presence; - : absence.

Table 2. Total phenol and flavonoid contents of ethanolic extract of *P. sordidum* and *P. saxatile*

| Plants | Total polyphenol content ($\mu\text{g GA/mg extract}$) | Total flavonoid content ($\mu\text{g quercetin/mg extract}$) |
|--------------------|--|--|
| <i>P. sordidum</i> | 32.72 \pm 0.3 | 16.52 \pm 0.4 |
| <i>P. saxatile</i> | 39.51 \pm 0.2 | 19.77 \pm 0.6 |

Values expressed are means \pm SD of three parallel measurements.

Table 3. DPPH radical-scavenging of ethanolic extract from *P. sordidum* and *P. saxatile* at different concentrations

| Name of plants | Antioxidant activity | 0.07 | 0.1 | 0.3 | 0.6 |
|--------------------|--|-------|-------|-------|-------|
| <i>P. sordidum</i> | Extract concentration (mg/mL) | 0.07 | 0.1 | 0.3 | 0.6 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 42.45 | 52.18 | 62.07 | 85.11 |
| | DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | | | | 0.093 |
| <i>P. saxatile</i> | Extract concentration (mg/mL) | 0.05 | 0.07 | 0.1 | 0.3 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 43.16 | 51.29 | 58.11 | 89.12 |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | 0.068 |
| Ascorbic acid | Extract concentration (mg/mL) | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 39.40 | 51.03 | 68.57 | 97.84 |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | 0.048 |

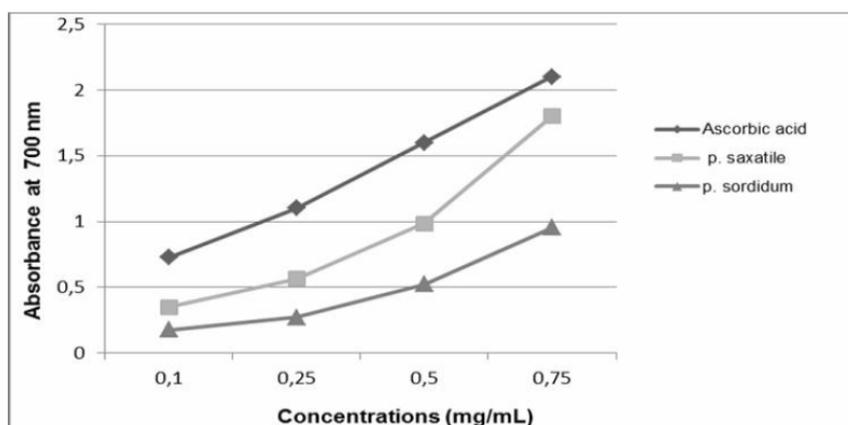


Figure 1. Reducing power of ethanolic extract of *P. sordidum* and *P. saxatile*

Conclusion

The ethanolic extracts of *P. sordidum* and *P. saxatile* were found to be effective antioxidants by in vitro assays. The *P. saxatile* ethanolic extract showed the better antioxidant activity which can be attributed to its high content of total polyphenols. According to these results, there is a relationship between the total phenol content and antioxidant activity. Indeed, it is extremely important to point out that there is a positive correlation between the antioxidant activity potential and the amount of phenolic compounds in the extracts. From the above results and discussion it can be concluded that the ethanolic extracts of *P. sordidum* and *P. saxatile* possesses the potent antioxidant substances and therefore may be proposed, as new potential sources of natural additives for the food and/or pharmaceutical industries.

References

- Agraval PK, 1989. Carbon-¹³ NMR of flavonoids. Studies in Organic Chemistry, vol 39. Elsevier, p 564.
- Ali-Shtayeh MS, Yaghmour MS, 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area, *J. Ethnopharmacol.* 60(3): 265-271.
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P, 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. de Pharma. De Belgique.* 49: 462-468.

Table 2. Total phenol and flavonoid contents of ethanolic extract of *P. sordidum* and *P. saxatile*

| Plants | Total polyphenol content ($\mu\text{g GA/mg extract}$) | Total flavonoid content ($\mu\text{g quercetin/mg extract}$) |
|--------------------|--|--|
| <i>P. sordidum</i> | 32.72 \pm 0.3 | 16.52 \pm 0.4 |
| <i>P. saxatile</i> | 39.51 \pm 0.2 | 19.77 \pm 0.6 |

Values expressed are means \pm SD of three parallel measurements.

Table 3. DPPH radical-scavenging of ethanolic extract from *P. sordidum* and *P. saxatile* at different concentrations

| Name of plants | Antioxidant activity | 0.07 | 0.1 | 0.3 | 0.6 | |
|--------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>P. sordidum</i> | Extract concentration (mg/mL) | 0.07 | 0.1 | 0.3 | 0.6 | |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 42.45 | 52.18 | 62.07 | 85.11 | |
| | DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | 0.093 |
| <i>P. saxatile</i> | Extract concentration (mg/mL) | 0.05 | 0.07 | 0.1 | 0.3 | |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 43.16 | 51.29 | 58.11 | 89.12 | |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | | 0.068 |
| Ascorbic acid | Extract concentration (mg/mL) | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 | |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 39.40 | 51.03 | 68.57 | 97.84 | |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | | 0.048 |

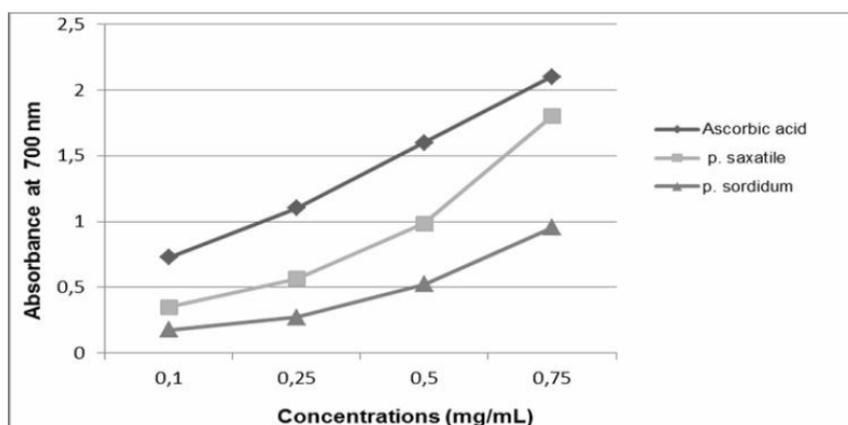


Figure 1. Reducing power of ethanolic extract of *P. sordidum* and *P. saxatile*

Conclusion

The ethanolic extracts of *P. sordidum* and *P. saxatile* were found to be effective antioxidants by in vitro assays. The *P. saxatile* ethanolic extract showed the better antioxidant activity which can be attributed to its high content of total polyphenols. According to these results, there is a relationship between the total phenol content and antioxidant activity. Indeed, it is extremely important to point out that there is a positive correlation between the antioxidant activity potential and the amount of phenolic compounds in the extracts. From the above results and discussion it can be concluded that the ethanolic extracts of *P. sordidum* and *P. saxatile* possess the potent antioxidant substances and therefore may be proposed, as new potential sources of natural additives for the food and/or pharmaceutical industries.

References

- Agrawal PK, 1989. Carbon-¹³ NMR of flavonoids. Studies in Organic Chemistry, vol 39. Elsevier, p 564.
- Ali-Shtayeh MS, Yaghmour MS, 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area, *J. Ethnopharmacol.* 60(3): 265-271.
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P, 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. de Pharma. De Belgique.* 49: 462-468.

- Barreiros ALBS, David JM, 2006. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim Nova*. 29:113-23.
- Bellakhdar J, 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Ibis press.
- Conforti F, Rigano D, 2010. Metabolite profile and *in vitro* activities of *Phagnalon saxatile* (L.) Cass, relevant to treatment of Alzheimer's disease, *J. Enzyme Inhib Med Chem*. 25(1): 97-104.
- Gülçin I, Oktay M, Kireççi E, Küfrevio lu I, 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food. Chem*. 83: 371-382.
- Harborne JB, 1998. *Phytochemical Methods*. Chapman Hall, London, p 60-66.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T, 1988. Two new flavonoids and other constituents in licore root: their relative astringency and radical scavenging affects. *Chem. Pharm. Bull*. 36: 1090-2097.
- Hausen BM, Schulz KH, 1977. On sensitizing capacity of naturally occurring quiones.3.new contact allergen (2-dimethylallyl-1, 4-benzoquinone) from *Phagnalon*, *Planta Medica*. 32(3): 287-296.
- Havsteen BH, 2002. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther*. 96: 67-202.
- Kokate, C.K., 1994. *Practical Pharmacognosy*. Vallabh Prakashan, New Delhi, pp. 107-113.
- Kuo SM, 1997. Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Crit Rev Oncog*. 8(1): 47-69.
- Li HB, Wong CC, Cheng KW, Chen F, 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Food Sci. Technol*. 41: 385-390.
- Okuda T, Yoshiba T, Hatano T, 1989. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med*. 55:117-22.
- Oyaizu M, 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan J Nutr*. 44: 307-315.
- Pham-Huy LA He H, Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Intern J Biomed Sci*. 4:89-96.
- Slinkard K, Singleton VL, 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic*. 28: 49-55.
- Wang H, Nair MG, Straburg GM, Booren AM, Gray JI, 1999. Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J. Agric. Food. Chem*. 47: 840-844.
- Yen GC, Hsieh CL, 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-Zhong (*Eucoma ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *J. Agric. Food. Chem*. 46: 3952-3957.

[PT4] *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*

Ilyas CHIKHI; Hocine ALLALI; Mohammed El Amine DI ; Alain MUSELLI; Nassim DJABOU; Boufeldja TABTI; Noureddine HALLA; Jean COSTA.

“Chemical composition, antimicrobial activity and free radical scavenging capacity of the essential oil and ethanol extract of *Calycotome villosa* subsp. *intermedia* from Algeria”, *Journal of Essential Oil Bearing Plants (JEOBP)*, **2013**.

Chemical composition, antimicrobial activity and free radical scavenging capacity of the essential oil and ethanol extract of *Calycotome villosa* ssp. *Intermedia* from Algeria.

Ilyas Chikhi^{a,*}, Hocine Allali^a, Mohammed El Amine Dib^a, Alain Muselli^b, Nassim Djabou^a, Boufeldja Tabti^a, Noureddine Halla^c and Jean Costa^b

^a *Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen
13000, Algérie*

^b *Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Université de Corse, UMR CNRS 6134, Campus
Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, France*

^c *Laboratoire des antibiotiques, antifongiques: physique chimie, synthèse et activité biologique,
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen, 13000, Algérie.*

** Corresponding author: Tel./Fax: +213 43286530; e-mail: chikhi.ilyas@gmail.com*

[PT5] *Atriplex halimus*

Ilyas CHIKHI ; Hocine ALLALI ; Mohamed El Amine DIB ; Houria MEDJDOUB ; Boufeldja TABTI.

“Antidiabetic activity of aqueous aerial part extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (APJTB), **2014**.

**Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in
Streptozotocin-Induced Diabetic Rats**

Ilyas Chikhi¹, Hocine Allali^{1,*}, Mohamed El Amine Dib¹, Houria Medjdoub², Boufeldja Tabti¹

¹*Laboratory of Natural and Bioactive Products (LASNABIO), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Abou Bekr Belkaïd University, BP119 Tlemcen 13000, Algeria.*

²*Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature and Life, University of Mascara, Algeria.*

Key words: *Atriplex halimus* L., Chenopodiaceae, Aqueous extract, Antidiabetic, Streptozotocin.

Foundation Project: Supported by the University of Tlemcen and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of the Algerian People's Democratic Republic for the granting of financial assistance under the project CNEPRU (Ref. E02020100067/2011-2013).

Abstract

Objective: *Atriplex halimus* L. leaf is used in the folk traditional medicine for the treatment of diabetes. Based on a number of reports on the blood glucose level reduction and the other complications of diabetes associated with some Chenopodiaceae plants, the antidiabetic effect of *A. halimus* leaf was investigated. **Methods:** The aqueous extract of the plant leaf was tested for its efficacy in streptozotocin-induced diabetic rats. (ii) The extract was evaluated for its acute and short term general toxicity in male mice and for its antihyperglycemic activity using glucose tolerance test in rats. (iii) The aqueous extract was subjected to phytochemical screening and determination of total phenolic contents. **Results:** The statistical data indicated the significant increase in the body weight and decrease in the blood glucose and levels hepatic. The total protein level was significantly increased when treated with the extract. **Conclusion:** These results suggest that the aqueous leaf extract of *A. halimus* has beneficial effects in reducing the elevated blood glucose level and levels hepatic of STZ-induced-diabetic rats.

*Corresponding author: Tel & Fax: (+213) 43.28.65.30 E-mails: h_allali72@yahoo.fr

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are thankful to Professor Noury BENABADJI of the Botanical Laboratory, Biology Department, Abou Bekr Belkaïd University for the identification of the vegetable matter.

[PT6] *Mentha spicata*

Hocine ALLALI; Ilyas CHIKHI; Mohamed El Amine DIB ; Alain MUSELLI; Nadia FEKIH;
Nawel MELIANI; Mohammad A. KAMAL; Boufelfja TABTI; Jean COSTA.

“Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and Hydrodistillation”, *Natural Products: An Indian Journal*, **2013**, Vol.9, Issue 6, 258-263.

Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and hydro-distillation

Hocine Allali¹, Ilyas Chikhi¹, Mohamed El Amine Dib^{1*}, Alain Muselli², Nadia Fekih¹, Nawel Meliani¹, Mohammad A.Kamal², Boufelfja Tabti¹, Jean Costa³

¹Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (LASNABIO), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen, (ALGERIA)

²Metabolomics & Enzymology Unit, Fundamental and Applied Biology Group, King Fahd Medical Research Center, King Abdulaziz University, P. O. Box 80216, Jeddah 21589, (SAUDIARABIA)

³Université de Corse, UMR CNRS 6134, Laboratoire Chimie des Produits Naturels, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corte, (FRANCE)

E-mail: a_dibdz@yahoo.fr

ABSTRACT

The essential oil of a *Mentha spicata* L. (collected from Algeria) was extracted by hydrodistillation and solid phase micro-extraction (SPME). The oils have been studied by GC and GC-MS. Thirty seven compounds identified in the aerial parts oil extracted by hydrodistillation, the principal components being carvone (48.42%), eucalyptol (17.6%) and neoiso-dehydrocarveol acetate (11.7%). On the other hand, the oil extracted by SPME showed eucalyptol (55.1%) as the principal component with moderate amounts of carvone (7.2%), (Z)-dehydro-carvone (4.3%), cis-carveol (3.9%) and carvacrol (3.0%). In addition, it should be noted that 11 compounds identified only in the volatile fractions extracted using HS-SPME and not identified in essential oils. Isolated essential oil was tested for radical-scavenging ability using the stable DPPH radical assay, which showed concentration-dependant antiradical activities, i.e. a percent of inhibition of 52.21% in the presence of 12.6 mg/mL.

© 2013 Trade Science Inc. - INDIA

KEYWORDS

Mentha spicata L.;
Lamiaceae;
Essential oil;
Chemical composition;
GC-MS;
SPME.

INTRODUCTION

Mentha is a well-known genus (family Lamiaceae) for medicinal and aromatic value. The genus *Mentha* includes 25–30 species that grow in the temperate regions of Eurasia, Australia and South Africa^[1]. These species showed considerable chemical diversity in essential oil composition. The genus is under cultivation from tropical to temperate climate of America, Europe,

China, Brazil, India, etc^[2]. *M. spicata* L. is a creeping rhizomatous, glabrous and perennial herb with a strong aromatic odor. The oil of *M. spicata* is rich in carvone and presents a characteristic spearmint odor^[3]. The species has been found useful as digestive and gastro-stimulant. Leaves are popularly used as tea-flavouring agent, while herbalists use whole plant as carminative^[4]. The fresh and dried plants and their essential oils are widely used in food, cosmetic, confectionary, chewing

Full Paper

gum, toothpaste and pharmaceutical industries^[5]. The essential oil of *M. spicata* showed strong insecticidal and mutagenic activity^[6]. Different chemotypes are characterized by distinct smells and bioactivities, indicating different uses in aromatic and medicinal industries^[7]. For instance, European enjoy carvone-scent, while Chinese prefer menthol-scent^[8]. *Mentha* L. accessions from different geographical population generally show numerous variations in the essential oil properties^[8,9]. Several chemotypes are observed in *Mentha* from various locations. For example, four chemotypes of *M. spicata* are found in Greece, characterized by the dominant occurrence of linalool, carvone/dihydrocarvone, piperitone oxide/piperitene oxide, and menthone/isomenthone/pulegone, respectively^[8,9]. Although the genus *Mentha* has been widely studied no investigations have been performed on the entire set of flavour volatiles of *M. spicata*. We have applied the headspace solid phase micro extraction (HS-SPME) and hydrodistillation extraction (HD) to extract the aroma volatiles of Algerian *M. spicata* before analysis. Briefly, the HS-SPME is used for the extraction of volatile compounds by the use of a fused silica fibre coated with different stationary phases. This is a common technique to evaluate the flavour compounds of various foods such as vegetables, fruits, juices, soft drinks or alcoholic beverages as recently reviewed from^[10]. To the best of our knowledge, no studies have been published on the characterization of Algerian *Mentha spicata* aroma compounds with SPME. In this paper, we report on the essential oil composition of *M. spicata*, growing in Algeria, extracted by hydrodistillation (HD) and solid phase micro-extraction (SPME) followed by GC-MS analysis to obtain the most complete profile and get a better knowledge of components. The final objective of the present study is to assess the antioxidant activity of essential oil.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and oil isolation

Mentha spicata L. was collected in Mai 2011 from Beloul 40km far from Saïda (868 (m), 34° 50' 03" N, 0° 09' 03" E) in the west northern region of Algeria. Voucher specimen was identified by Pr Nouri BENABADJI of Department of Biology - University

of Tlemcen, Algeria and deposited in the institutional herbarium. The plants were cut at ground surface and taken to laboratory to extract essential oil. Chopped plants were used fresh for determination of essential oil content by hydrodistillation method using Clevenger-type apparatus at 60°C for 3 h. The essential oil was dried with anhydrous sodium sulphate, stored at 4°C and used for GC-MS analysis. The essential oil content (%) was determined on fresh weight basis as an average of three samples.

Gas chromatography analysis (GC)

GC analysis was performed using a Perkin-Elmer Clarus 600 GC apparatus (Walton, MA, USA) equipped with a single injector and two flame ionization detectors (FID). The analysis was carried out using two fused silica capillary columns (60 m; 0.22 mm i.d.; film thickness 0.25 µm) with different stationary phases: Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). The operating conditions were as follows: Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Helium was used as carrier gas (1 mL/min), the injection volume was 0.1 µL, split ratio was adjusted at 1:80, the oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at the rate of 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 30 min.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS)

The oils were investigated using a Perkin Elmer Turbo Mass quadrupole analyzer, directly coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Other GC conditions were the same as described above. Ion source temperature: 150°C; energy ionization: 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35 – 350 Da; scan mass: 1s. Oil injected volume: 0.1 µL.

HS-SPME conditions

The aerial parts of *M. spicata* were cut roughly with scissors (1 - 2 cm long) before subjection to HS-SPME. The SPME device (Supelco) coated with divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, 30 µm) was used for extraction of the plant volatiles. Optimization of conditions was carried

Full Paper

out using fresh aerial parts of the plant (1 g in a 20 mL vial) and based on the number and the sum of total peak areas measured on GC-FID. Temperature, equilibration time and extraction time were selected after nine experiments combining four temperatures (30, 50, 70 and 90°C), four equilibration times (20, 40, 60 and 80 min) and three extraction times (15, 30 and 45 min). After sampling, SPME fibre was inserted into the GC and GC-MS injection ports for desorption of volatile components (5 min), both using the splitless injection mode. Before sampling, each fibre was reconditioned for 5 min in the GC injection port at 260°C. HS-SPME and subsequent analyses were performed in triplicate.

Component identification

The identification of the oil components was performed by their retention indices (RI), authentic reference compounds, peak matching library search, as well as published mass spectra^[11-14]. Retention indices were calculated using an *n*-alkane series (C7–C25) under the same GC conditions as for the samples. The relative amount (%) of individual components of the oil is expressed as percent peak area relative to total peak area from the GC/FID analyses of the whole extracts.

Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity of the samples was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging^[15]. In test tubes, 0.25 mL of DPPH 0.8 mM in MeOH was added to accurately weighed

aliquots of the extracts dissolved in 3.75 mL of MeOH, corresponding to concentration ranges of extract between 0.01 to 0.2 mg/mL. After mixing, the samples were maintained in the dark, at room temperature for 30 min. The absorbance at 517 nm was measured using a U.V/VIS Spectrophotometer (Optizen POP) and compared with a control without extract. A blank was prepared for each sample using methanol instead of the DPPH solution. Ascorbic acid was used as reference compound. Antioxidant activity was expressed as a percent inhibition of DPPH radical, and calculated from the equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 100.$$

$$\text{Abs control} - \text{Abs sample} / \text{Abs control}$$

IC₅₀ values were determined from the plotted graphs of scavenging activity against the concentration of the extracts. These values are defined as inhibitory concentration of the extract necessary to decrease the initial DPPH radical concentration by 50% and are expressed in mg/mL. Triplicate measurements were carried out.

RESULTS AND DISCUSSION

The aerial parts of *M. spicata* yielded 1,27±0,02% (w/w) (calculated on a dry weight basis) of a pale-greenish oil. The components identified from *M. spicata* oil, their retention indices and their percentage composition are summarized in TABLE 1 where all the com-

TABLE 1 : Volatile compounds identified in *M. spicata* using HS-SPME and hydrodistillation.

| N° | Compounds ^a | RI _a ^b | RI _a ^c | RI _p ^d | HD | SPME | Identification ^e |
|----|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------|------|-----------------------------|
| 1 | 3-methyl 1-Butanol | 717 | 710 | / | - | 0.3 | RI. MS. Ref.1 |
| 2 | Hexanal | 780 | 772 | / | - | 0.2 | RI. MS. Ref.1 |
| 3 | Heptanal | 876 | 878 | 1187 | tr | 0.2 | RI. MS |
| 4 | α -Thujene | 922 | 924 | 1023 | 0.5 | 0.4 | RI. MS |
| 5 | α - Pinene | 931 | 932 | / | - | 2.6 | RI. MS |
| 6 | 6-methyl-3-Heptanone | 935 | 937 | 1320 | - | 0.3 | RI. MS. Ref.1 |
| 7 | Camphene | 943 | 945 | 1069 | 0.7 | 0.2 | RI. MS |
| 8 | 6-Methylhept-5-en-2-one | 946 | 952 | / | - | 0.4 | RI. MS |
| 9 | Sabinene | 964 | 967 | 1122 | - | 1.6 | RI. MS |
| 10 | β -pinene | 970 | 972 | 1112 | 1.0 | 1.0 | RI. MS |
| 11 | 3-Octanol | 986 | 981 | 1387 | 1.4 | 3.4 | RI. MS |
| 12 | Myrcene | 979 | 981 | 1160 | 0.9 | 0.5 | RI. MS |
| 13 | 3-methyl butylIsobutyrate | 994 | 994 | / | - | 0.5 | RI. MS. Ref.1 |
| 14 | α -Phellandrene | 997 | 1006 | / | - | 0.3 | RI. MS |
| 15 | α -Terpinene | 1008 | 1011 | 1180 | - | 1.5 | RI. MS |
| 16 | <i>p</i> -Cymene | 1011 | 1014 | 1268 | 0.1 | - | RI. MS |
| 17 | Eucalyptol | 1020 | 1025 | 1203 | 17.6 | 55.1 | RI. MS |

Full Paper

| N° | Compounds ^a | RI _a ^b | RI _a ^c | RI _p ^d | HD | SPME | Identification ^e |
|----|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------|------|-----------------------------|
| 18 | (Z)-β-Ocimene | 1024 | 1027 | 1231 | 0.4 | 0.3 | RI, MS |
| 19 | (E)-β-Ocimene | 1034 | 1038 | 1239 | 0.2 | - | RI, MS |
| 20 | γ-Terpinene | 1047 | 1050 | 1244 | 0.3 | 0.7 | RI, MS |
| 21 | trans-hydrate Sabinene | 1051 | 1055 | 1457 | 1.5 | 0.8 | RI, MS |
| 22 | Terpinolene | 1078 | 1081 | 1282 | 0.1 | 0.3 | RI, MS |
| 23 | Nonanal | 1083 | 1084 | 1374 | 0.1 | tr | RI, MS |
| 24 | Linalol | 1081 | 1084 | 1554 | 0.1 | - | RI, MS |
| 25 | 3-octyl Acetate | 1111 | 1110 | 1332 | 0.2 | tr | RI, MS |
| 26 | Limonene-1,2-epoxyde-Z | 1117 | 1117 | / | - | 0.1 | RI, MS |
| 27 | (Z)-Linalol-oxide | 1148 | 1143 | / | - | 0.2 | RI, MS |
| 28 | Borneol | 1148 | 1151 | 1687 | 0.2 | 0.1 | RI, MS |
| 29 | Terpinene-4-ol | 1161 | 1164 | 1598 | 0.9 | 2.5 | RI, MS |
| 30 | (Z)-dehydro-Carvone | 1173 | 1173 | 1616 | 1.3 | 4.3 | RI, MS |
| 31 | α-Terpineol | 1176 | 1178 | 1699 | 0.5 | 0.1 | RI, MS |
| 32 | Neoiso-dehydro-Carveol | 1178 | 1180 | 1743 | 11.7 | 3.5 | RI, MS |
| 33 | cis-Carveol | 1208 | 1206 | 1822 | - | 3.9 | RI, MS |
| 34 | Carvone | 1222 | 1223 | 1724 | 48.4 | 7.2 | RI, MS |
| 35 | Pulegone | 1222 | 1222 | / | - | 0.2 | RI, MS |
| 36 | Carvotanacetone | 1230 | 1224 | / | - | 0.7 | RI, MS |
| 37 | Carvacrol | 1282 | 1278 | / | - | 3.0 | RI, MS |
| 38 | neodehydroCarvyleacetate | 1311 | 1312 | 1665 | 1.1 | tr | RI, MS |
| 39 | (E)-Jasmone | 1364 | 1369 | 1889 | 0.3 | 0.2 | RI, MS |
| 40 | β-Bourbonene | 1385 | 1384 | 1511 | 1.2 | 0.2 | RI, MS |
| 41 | β-Elementene | 1388 | 1389 | 1587 | 0.8 | - | RI, MS |
| 42 | (E)-β-Caryophyllene | 1424 | 1419 | 1593 | 2.1 | 0.2 | RI, MS |
| 43 | Germacrene D | 1480 | 1477 | 1706 | 1.1 | - | RI, MS |
| 44 | bicycle-Germacrene | 1494 | 1491 | 1718 | 0.3 | - | RI, MS |
| 45 | β-Bisabolene | 1500 | 1500 | 1729 | tr | - | RI, MS |
| 46 | Trans-Calamenene | 1512 | 1510 | 1810 | 0.1 | - | RI, MS |
| 47 | δ-Cadinene | 1516 | 1515 | 1752 | tr | - | RI, MS |
| 48 | α-Cadinene | 1536 | 1531 | 1736 | tr | - | RI, MS |
| 49 | τ-Cadinol | 1632 | 1638 | 2195 | 0.2 | - | RI, MS |
| | Total (%) | | | | 95.3 | 97.0 | |
| | Hydrocarbon compounds | | | | 9.8 | 10.2 | |
| | Oxygenated compounds | | | | 85.5 | 87.2 | |
| | Hydrocarbon monoterpenes | | | | 4.2 | 9.4 | |
| | Hydrocarbon sesquiterpenes | | | | 5.6 | 0.4 | |
| | Oxygenated monoterpenes | | | | 83.6 | 81.9 | |
| | Oxygenated sesquiterpenes | | | | 0.2 | - | |
| | Aliphatic compounds | | | | 1.7 | 5.3 | |

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1), ^b Retention indices of literature on the apolar column (RI_a) reported from König et al., 2001, ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RI_a), ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RI_p), ^e RI: Retention Indices; MS: Mass Spectrometry in electronic impact mode; Refl.: compounds identified from literature data König et al., 2001.

pounds are arranged in order of their elution on the RTX-1 column. The principal compounds (>1.0%)

Full Paper

appear in bold face. Two different columns, a polar (RTX-1) and a non-polar (RTX-Was), have been used in the GC-MS analysis to identify the majority of the components. An analysis of the essential oil of *M. spicata* harvested in west northern region of Algeria identified 37 components, which accounted for 95.3% of the total number. Their retention indices and relative percentages are shown in TABLE 1. Among these, 24 monoterpenes, 10 sesquiterpenes and 4 aliphatic compounds were identified. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC-retention indices with those of our laboratory-produced "Arômes" library, with the exception of four components that were identified by comparison with spectral data and retention indices from the literature. The oil extracted by hydrodistillation was characterized by a large amount of monoterpenes (87.8%) made up of oxygenated monoterpenes (83.6%) and hydrocarbon monoterpenes (4.2%). Hydrocarbon compounds represented only 10.28% of the oil, most of them being oxygenated (32.7%). The principal compounds were found to be carvone (48.42%), eucalyptol (17.6%) and neoisodehydrocarveol acetate (11.7%). Other representative compounds were identified as (E)- β -Caryophyllene (2.1%), trans-hydrate sabinene (1.5%), 3-Octanol (1.4%), (Z)-dehydrocarvone (1.3%), β -bourbonene (1.2%), neo isodehydrocarvyle acetate (1.1%), germacrene D (1.1%) and β -pinene (1.0%) were minor constituents of the oil.

The oil vapour adsorbed by headspace SPME showed higher amounts of monoterpenes (91.3%) than sesquiterpenes (0.4%). As in the hydrodistilled oil, oxygenated monoterpenes (81.9%) were found in higher amounts than the hydrocarbons (9.4%). However, sesquiterpenes are represented only by hydrocarbon sesquiterpenes (0.4%). Other characteristic compounds of the oil were identified as cis-carveol (3.9%), car-

vacrol (3.0%), α -pinene (2.6%), terpinene-4-ol (2.5%), sabinene (1.6%) and α -terpinene (1.5%). Quantitative but not qualitative differences have been found in the chemical composition of both analysed samples depending of the extraction method. Carvone (7.2-48.4%) was found as the principal component of this species but it was found in greater concentrations in the essential oil than in the SPME extracts. Inversely, eucalyptol (17.6-55.1%) was found in greater concentrations in the SPME extracts than in the hydrodistillation ones. The chemical differences observed between both the essential oils and the volatile fractions extracted using HD and SPME, respectively, can be explained by the fact that the first technique is based on the liquid quasitotal extraction of plant volatiles and the latter technique is controlled by a solid/gas equilibrium step. During hydrodistillation, the most volatile compounds and water-soluble compounds are lost in the gaseous phase and in the hydrolate, respectively, whereas, with HS extraction, it is the fiber affinity of each compound that monitors the sampling of the volatiles. As a consequence, it should be noted that 11 compounds (1, 2, 5, 8, 1, 14, 26, 27, 35, 36 and 37) were identified only in the volatile fractions extracted using HS-SPME. As stated above the oil from *M. spicata* is characterized by high amount of eucalyptol. This compound does not usually appear as dominant in oils of other *Mentha* species.

Radical scavenging activity

DPPH method has been widely used in the determination of the antiradical activity of single compound as well as different plant essential oils. This method is based on the reduction of alcoholic DPPH solutions in the presence of a hydrogen donating antioxidant. The method was used to evaluate the antioxidant properties of the *M. spicata* in comparison with the synthetic antioxidant (ascorbic acid). As shown in TABLE 2, this

TABLE 2 : Antioxidant activity of essential oil of *M. spicata* using DPPH testing method.

| Sample | Antioxidant activity | | | | |
|---------------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Oil | Extract concentration (mg/mL) | 0.2 | 4.2 | 6.3 | 12.6 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 16.32 | 32.72 | 42.64 | 52.21 |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | 10.62 |
| Ascorbic acid | Extract concentration (mg/mL) | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.08 |
| | Scavenging effect on DPPH (%) | 39.40 | 51.03 | 68.57 | 97.84 |
| | DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | | | | 0.048 |

Natural Products

An Indian Journal

Full Paper

essential oil showed concentration-dependant antiradical activities. These results show a percent of inhibition of 52.21% in the presence of 12.6 mg/mL. The antioxidant activity of the essential oil can be also evaluated by the determination of the IC₅₀ values corresponding to the amount of extract required to scavenge 50% of DPPH radicals present in the reaction mixture. High IC₅₀ values indicate low antioxidant activity. Assessed sample was able to reduce the stable violet DPPH radical to the yellow DPPH, reaching 50% of reduction with IC₅₀ value of 10.62 mg/mL. This IC₅₀ values was less than the IC₅₀ obtained for ascorbic acid (0.048 mg/mL) used as positive control. In addition, the antioxidant activity of our essential oil is probably due to the presence of great amount of oxygenated compounds (85.5%).

CONCLUSIONS

In this work, we were able to show that the chemical composition of *M. spicata* essential oil from west-Northern of Algeria is dominated by carvone (7.2-48.4%) and eucalyptol (17.6–55.1%). So, this study demonstrates that HD and HS-SPME modes could be complimentary extraction techniques in order to obtain the complete characterization of plant volatiles. Other hand, essential oil showed moderate antioxidant activity.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Professor Noury BENABADJI of the Botanical Laboratory, Biology Department, Abou Bekr Belkaïd University for the identification of the vegetable matter.

REFERENCES

- [1] H.J.Dorman, M.Kosar, K.Kahlos, Y.Holm, R.Hiltunen; J.Agric.Food Chem., **51**, 4563 (2003).
- [2] S.P.S.Khanuja; Employ contract farming to boost area under cultivation for essential oil bearing crops. In Business enabling of aromatic plants and products, 21e22 November 2007 at HRDI Dehradun. Chemical weekly, 25 December, 180e184 (2007).
- [3] L.Jirovetz, G.Buchbauer, M.Shabi, M.B.Ngassoum; Perfum.Flav., **27**, 16 (2002).
- [4] Y.M.Yonis, S.M.Beshir; J.Essent.Oil Res., **16**, 539 (2004).
- [5] B.M.Lawrence; Mint: The Genus *Mentha*. CRC Press, Boca Raton, FL, (2006).
- [6] R.Karousou, M.Balta, E.Hanlidou, L.Kokkini; Mints, smells and traditional uses in Thessaloniki (Greece) and other Mediterranean countries. J.Ethnopharmacol., **109**, 248 (2007).
- [7] D.Zhao, Y.Wen Xu, Guo.Li Yang, M.Amjad, Wei Wu.Husaini; Ind.Crop.Prod., **42**, 251 (2013).
- [8] A.Orav, A.Raal, E.Arak; Proc.Est.Acad.Sci.Chem., **53**, 174 (2004).
- [9] G.Kofidis, A.Bosabalidis, S.Kokkini; J.Essent.Oil Res., **16**, 469 (2004).
- [10] H.Kataoka, H.L.Lord, J.Pawliszyn; Journal of Chromatography A., **880**, 35 (2000).
- [11] Arômes library of Laboratory of Chemistry of Natural Products.University of Corse, Corte, France.UMR CNRS 6134, (1987–2011).
- [12] W.A.König, D.H.Hochmuth, D.Joulain; Terpenoids and related constituents of essential oils. Library of Mass Finder 2.1 University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, (2001).
- [13] R.P.Adams; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, (2007).
- [14] NIST/EPA/NIH, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, Version 2.1. Perkin Elmer Instrument LLC, Copyright, (2000).
- [15] O.P.Sharma, T.K.Bhat; Food Chem., **113**(4), 1202 (2009).

Résumé :

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent à la valorisation des plantes médicinales aromatiques de l'ouest d'Algérie en utilisant les outils chromatographiques (CPG et CPG/SM) pour établir le profil chimique des mélanges complexes des huiles essentielles de *Phagnalon sordidum* L., *Phagnalon saxatile*, *Atriplex halimus*, *Iris planifolia*, *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*.

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est étudié par la méthode de la dilution en milieu liquide, sur des souches bactériennes de références. En outre, l'activité antioxydante des huiles essentielles est également testée par la méthode de la réduction du radical DPPH et par la réduction du fer. L'activité antidiabétique de l'extrait aqueux brut d'*Atriplex halimus* est étudiée sur des rats Wistar rendu diabétiques par streptozotocine.

Mots clés: Produits naturels, Huiles essentielles, CPG et CPG/SM, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante, Activité antidiabétique.

Abstract :

This study contributes to the recovery of aromatic and medicinal plant growing in the west of Algeria by using chromatography (GC and GC/MS) to establish the chemical profile of complex mixtures of essential oils of *Phagnalon sordidum* L., *Phagnalon saxatile*, *Atriplex halimus*, *Iris planifolia*, *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*.

The antimicrobial effect of essential oils is studied by the method of broth dilution on bacterial reference strains. On the other hand, the antioxidant activity of essential oils is tested by the method of reduction of DPPH radical and iron reduction. The antidiabetic activity of the aqueous crude extract of *Atriplex halimus* is studied in Wistar rats made diabetic by streptozotocin.

Keywords: Natural products, Essential oils, GC and GC/MS, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Antidiabetic activity.

الملخص:

هذه الأطروحة تهتم بدراسة النباتات العطرية الطبية، المتواجدة في غرب الجزائر، وذلك باستخدام تقنيات التحليل الكروماتوجرافي (CPG/SM) و (CPG) لتحديد التركيب الكيميائي للزيوت العطرية المعقدة للنباتات:

Phagnalon sordidum L., *Phagnalon saxatile*, *Atriplex halimus*, *Iris planifolia*, *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*.

دراسة فعالية هذه الزيوت ضد البكتيريا و قدرتها المضادة للأكسدة، ومن جهة أخرى قدرة المستخلص المائي للنبات *Atriplex halimus* في تخفيض نسبة السكري لدى فئران التجارب.

الكلمات المفتاحية: المواد الطبيعية، الزيوت العطرية، (CPG) et (CPG/SM) تفاعل مضاد للجراثيم، تفاعل مضاد للأكسدة، تفاعل مضاد للسكري.