

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

« Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) »

**THÈSE**

Pour l'obtention du diplôme de doctorat en

**Biologie**

Option : **Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse**

Présentée par : **M<sup>r</sup> Gherib Mohammed**

*Thème*

**Analyse des huiles essentielles de *Warionia saharae* Benth. & Hook. et de *Pulicaria mauritanica* Coss. de l'ouest Algérien (Nâama) par CPG(Ir), CC, CPG/SM et RMN <sup>13</sup>C et étude de leur pouvoir antimicrobien**

Soutenue le :

Devant le jury composé de :

Président :	<b>M<sup>me</sup> Bendimered N.</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. de Tlemcen</b>
Examineurs :	<b>M<sup>r</sup> Bellahcen M.</b>	<b>Professeur</b>	<b>C. U. d'A. Témouchent</b>
	<b>M<sup>r</sup> Marouf A.</b>	<b>Professeur</b>	<b>C.U. de Nâama</b>
	<b>M<sup>r</sup> Tomi F.</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. de Corse</b>
Directeur de thèse :	<b>M<sup>me</sup> Atik-Bekkara F.</b>	<b>Professeur</b>	<b>U. de Tlemcen</b>
Co-directeur :	<b>M<sup>me</sup> Bekhechi C.</b>	<b>M. de Conférences</b>	<b>U. de Tlemcen</b>

Année universitaire : 2014 - 2015

*À la mémoire de mon père*

*À ma mère*

*À ma chère femme*

*À mes chers enfants*

*Pour leur présence de tous les instants*

*Pour le soutien qu'ils m'ont apporté*

*Avec toute mon affection et ma reconnaissance*

## *Remerciements*

Ce travail a été réalisé au Département de Biologie, laboratoire de « Produits Naturels », équipe, « Flavonoïdes, Huiles essentielles et Activités Biologiques », sous la direction de M<sup>me</sup> **ATIK BEKKARA F.**, en collaboration avec le laboratoire de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse, sous la direction de Monsieur le Professeur **TOMI Félix**.

*J'*adresse en premier lieu mes remerciements les plus sincères à M<sup>me</sup> le Professeur **ATIK BEKKARA Fewzia**, pour avoir dirigé cette thèse. J'ai apprécié la liberté qu'elle m'a laissée dans la conduite de mes recherches. Elle m'a témoigné une confiance presque illimitée. Sa confiance, son soutien, sa disponibilité et ses conseils avisés m'ont permis de réaliser mon travail dans les meilleures conditions.

*Je* profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer à M<sup>me</sup> **BEKHECHI Chahrazed**, Maître de Conférences à l'université de Tlemcen ma respectueuse gratitude. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité, ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse. J'ai trouvé en elle un co-directeur ouverte qui m'a guidé dans mon travail tout au long de ces années. Je la remercie de s'être souciée de mon devenir.

*Je* suis très sensible à l'honneur que me fait M<sup>me</sup> **BENDIMERED Nassima**, Professeur à l'université de Tlemcen, en acceptant d'être le président de ce jury.

*Je* tiens particulièrement à remercier M<sup>r</sup> **TOMI Félix**, Professeur à l'université de Corse, pour avoir bien voulu participer à ce jury et aussi pour l'accueil dans son laboratoire « Chimie et Biomasse » et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens matériels permettant la réussite de mon projet de thèse.

*Je* veux exprimer, ma respectueuse gratitude à M<sup>r</sup> **MAROUF Abderrazek**, Professeur au centre universitaire de Nâama, pour avoir bien voulu participer à ce jury. Je le remercie de m'avoir fait profiter de son expérience et de sa rigueur scientifique.

*Que* M<sup>r</sup> **BELLAHCEN Miloud**, Professeur au centre universitaire d'Aïn Témouchent, trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il a bien voulu apporter à ce travail en acceptant de participer à ce jury.

*Mes* remerciements vont également à M<sup>r</sup> le Professeur **CASANOVA Joseph** et M<sup>r</sup> le Professeur **BIGHELLI Ange** (Université de Corse) pour leur aide dans la rédaction des

publications ainsi que les membres de l'équipe « Chimie et Biomasse » et en particulier XU Tao, pour son aide dans les analyses de nos huiles essentielles.

*Enfin*, ma profonde gratitude va à l'égard de toutes les personnes qui ont aimablement contribué à la réalisation de ce travail par leur aide et encouragement (Elhaci Imad, Benhammou Nabila, Didi Amel, Azzi Rachid, Jaafar, Benali, Mebarki, Sid Ahmed, Djillali).

## Résumé

Les travaux présentés dans ce mémoire contribuent à l'étude phytochimique de deux espèces médicinales, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle Algérienne. L'objectif de notre étude était, d'une part, de contribuer à la caractérisation par CPG (Ir), CC, CPG/SM et RMN du  $^{13}\text{C}$  de la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir de deux espèces : *Warionia saharae* Benth. & Hook. et *Pulicaria mauritanica* Coss., poussant à l'état spontané dans la région de Nâama (ouest de l'Algérie), et d'autre part, de contribuer à l'étude du pouvoir antimicrobien de ces huiles essentielles vis-à-vis des souches de référence.

L'huile essentielle de *Warionia saharae* est riche en sesquiterpènes oxygénés (53,6%), suivis par les monoterpènes oxygénés (22,7%). Les composants majoritaires sont : (*E*)-nérolidol (25,7%),  $\beta$ -eudesmol (25,0%) et linalol (17,1%). L'analyse de 16 échantillons d'huile essentielle de *Warionia saharae* associée à un traitement statistique des données a permis de mettre en évidence une variabilité chimique intraspécifique. Ainsi, les échantillons se répartissent en deux groupes selon les teneurs des composés suivants :  $\beta$ -eudesmol (17,6-32,9%), (*E*)-nérolidol (15,8-30,4%) et linalol (15,3-32,1%).

L'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* est riche en monoterpènes oxygénés dont un composé nettement majoritaire, la carvotanacétone qui représente 89,2%.

La composition chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* est principalement dominée par les dérivés oxygénés du *p*-cymène : soient : le 2,5-diméthoxy-*p*-cymène (37,2 g/100g), l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle (14,2 g/100g), l'isobutyrate de néryle (11,1 g/100g), l'isobutyrate de thymyle (3,1 g/100g) et la **modhéphan-3-one** (4,1 g/100g). Cette cétone sesquiterpénique tricyclique dont la structure a été élucidée en utilisant la spectroscopie RMN à deux dimensions, est signalée pour la première fois en tant que composé naturel.

L'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles de *P. mauritanica* des parties aériennes et des racines montre une homogénéité et une stabilité de la composition chimique.

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique des huiles essentielles de ces deux plantes a été menée en déterminant le paramètre (CMI). Ainsi, l'huile essentielle des parties aériennes *P. mauritanica* est la plus active. Les souches microbiennes les plus sensibles sont : *Citrobacter freundii* et *Candida albicans* qui sont inhibées à des CMI's faibles de l'ordre de 2  $\mu\text{l/ml}$ . De même, les moisissures se sont montrées sensibles, inhibées à CMI's variant entre 2 et 3  $\mu\text{l/ml}$ .

**Mots clés :** *Warionia saharae* Benth. & Hook., *Pulicaria mauritanica* Coss., CPG (Ir), CPG/SM et RMN du  $^{13}\text{C}$ , pouvoir antimicrobien, CMI.

## ***Abstract***

The work presented in this memory contributes under investigation phytochimic of two medicinal species used in the Algerian traditional pharmacopeia. The objective of our study was, on the one hand, to contribute to the characterization by GC(Ir), GC/SM and NMR of the <sup>13</sup>C of the chemical composition of the essential oil obtained from two species: *Warionia saharae* Benth. & Hook. and *Pulicaria mauritanica* Coss., growing in a spontaneous state in the region of Nâama (western of Algeria), and in addition, to contribute under investigation of the antimicrobial activity of the essential oil against the reference strains.

The essential oil of *W. saharae* is rich in oxygenated sesquiterpenes (53.6%), followed by oxygenated monoterpenes (22.7%). The majority components are: (*E*)-nerolidol (25.7%),  $\beta$ -eudesmol (25.0%) and linalool (17.1%). Analysis of 16 essential oil samples of *W. saharae* associated with a statistical treatment of data samples allowed to identify intraspecific chemical variability. Thus, the samples are divided into two groups according to the contents of the following compounds:  $\beta$ -eudesmol (17.6-32.9%), (*E*)-nerolidol (15.8-30.4%) and linalool (15.3-32.1%).

The essential oil of the aerial parts of *P. mauritanica* is rich in oxygenated monoterpenes, which a compound extensively dominated, the carvotanacetone that accounts for 89.2%.

The chemical composition of the essential oil of the roots of *P. mauritanica* is mainly dominated by the oxygenated derivatives of *p*-cymene are: 2,5-dimethoxy-*p*-cymene (37.2 g/100g), 6-methoxythymyl isobutyrate (14.2 g/100g), neryl isobutyrate (11.1 g/100g), thymyl isobutyrate (3.1 g/100g) and modhephan-3-one (4.1 g/100g). This tricyclic sesquiterpene ketone whose structure has been elucidated using NMR spectroscopy to two dimensions, is shown for the first time as a natural compound. The study of the chemical variability of the essential oils of *P. mauritanica* aerial parts and roots showed homogeneity and stability of the chemical composition.

The study of antibacterial and antifungal activity of essential oils of these two plants was carried out by determining the parameter (MIC). Thus, essential oil of the aerial parts of *P. mauritanica* is the most active. The most sensitive strains are: *Citrobacter freundii* and *Candida albicans* wich are inhibited with MICs values 2 $\mu$ l/ml. Similary, the filamentous fungi were sensitive, inhibited MICs ranging between 2 and 3 $\mu$ l/ml.

**Keywords :** *Warionia saharae* Benth. & Hook., *Pulicaria mauritanica* Coss., GC(Ir), GC/MS and NMR <sup>13</sup>C, Antimicrobial activity, MIC.

## المخلص

الأعمال المعروضة في هذه المذكرة تساهم في دراسة التركيبة الكيميائية لنوعين من النباتات الطبية المستخدمة في قائمة الأدوية التقليدية الجزائرية. و الهدف من هذه الدراسة من الناحية الأولى الأسهام في تحديد خصائص التركيبة الكيميائية عن طريق الفصل الكروماتوغرافي الغازي (CPG/Ir)، الفصل الكروماتوغرافي الغازي/قياس الطيف الكتلي (CPG/SM)، الرنين المغناطيسي النووي للكربون 13 ( $^{13}C$  RMN) للزيوت الأساسية المحصل عليها من صنفين من الأعشاب هما : *Pulicaria mauritanica* Coss. و *Warionia saharae* Benth. & Hook. التي تنبت تلقائيا في منطقة النعامة الواقعة غرب الجزائر. و من ناحية أخرى دراسة القدرة المضادة للبكتريا للزيوت الأساسية.

الزيت الأساسي لنبته *Warionia saharae* غني بالسيكيتريان الأكسجينية (53.6%) متبوع بالتربان الأحادية الأكسجينية (22.7%). المركبات الغالبة هي E-نيروليدول (25.7%)،  $\beta$ -أوديسمول (25.0%) و لينالول (17.1%). دراسة التغير الكيميائي للزيت الأساسي ل 16 عينة لنبات ال *Warionia saharae* سمحت لنا بملاحظة تغير كيميائي كمي خاصة بالنسبة للمركبات التالية :  $\beta$ -أوديسمول (32.9-17.6%)، E-نيروليدول (30.4-15.8%)، و لينالول (32.1-15.3%).

الزيت الأساسي للجزء الهوائي ل *Pulicaria mauritanica* غني بالتربان الأحادية الأكسجينية منه مركب جلي الأكتريية ، الكرفوتاناسيتون و الذي يمثل نسبة 89.2%.

تركيبة الزيت الأساسي لجذور *P. mauritanica* تميزت بوجود جزيئات أساسية مشتقات أكسجينية للبارسيمان ، 5، 2-ديميتوكسي-P-سيمان (37.2 غ/100 غ) ، إيزوبيتيرات 6-ميتوكسيثيميل (14.2 غ/100 غ) ، إيزوبيتيرات النيريل (11.1 غ/100 غ) ، إيزوبيتيرات ثيميل (3.1 غ/100 غ) و مودهفان3ون (4.1 غ/100 غ). هذا السيتون السيكستريبيني ثلاثي الحلقات أين البنية حددت باستعمال الرنين المغناطيسي النووي (RMN) ثنائي الأبعاد يشير لأول مرة على أنه مركب طبيعي.

دراسة التغير الكيميائي للزيوت الأساسية ل *P. mauritanica* للجزء الهوائي و الجذور أظهر تجانس و استقرار في التركيبة الكيميائية.

دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا و المضادة للفطريات للزيوت الأساسية لهاتين النباتين تمت بتحديد التركيز الأدنى المثبط (CMI) لهذه الجراثيم. هذه الدراسة سمحت لنا بإظهار القدرة العالية المضادة للبكتيريا و الفطريات للزيت الأساسي للجزء الهوائي *P. mauritanica* Y السلالات الأكثر حساسية *Citrobacter freundii* ! *Candida albicans* و المثبطة بقيم ضعيفة للتركيز الأدنى المثبط و المقدر ب 2 ميكرو لتر / . كذلك أظهرت الفطريات حساسية حيث تراوحت قيمة التركيز الأدنى المثبط بين 2 إلى 3 ميكرو لتر / .

الكلمات المفاتيح: CPG(Ir),  $\square$  *Pulicaria mauritanica* Coss., *Warionia saharae* Benth. & Hook.

$^{13}C$  RMN, CPG/SM، القدرة المضادة للبكتيريا، التركيز الأدنى المثبط.

## Table des matières

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique des plantes étudiées</b>	<b>6</b>
I. Famille des Astéracées	6
I.1. Généralités	6
I.2. Description botanique	6
<b>II. Le genre <i>Warionia</i></b>	<b>7</b>
II.1. Description botanique	7
II.2. Systématique de l'espèce <i>Warionia saharae</i>	7
II.3. Propriétés thérapeutiques	8
II.4. Etude bibliographique	8
<b>III. Le genre <i>Pulicaria</i></b>	<b>10</b>
III.1. Description botanique	10
III.2. Systématique de l'espèce <i>Pulicaria mauritanica</i>	11
III.3. Propriétés thérapeutiques	11
III.4. Etude bibliographique	11
<b>Chapitre II. Les différentes techniques d'extraction d'analyse des constituants dans un mélange naturel</b>	<b>14</b>
I. Techniques d'extraction des constituants dans un mélange naturel	14
I.1. Techniques de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur	14
I.2. Technique d'extraction par les solvants	15
I.3. Technique d'extraction par des les fluides supercritiques	15
I.4. Technique d'extraction assistée par micro-ondes	16
II. Identification des constituants dans un mélange complexe	17
II.1. Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A	18
II.1.1. Chromatographie en Phase Gazeuse et les indices de rétention	18
II.1.2. Quantification par CPG en mettant en œuvre les facteurs de réponse (FR)	19
II.1.3. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique	20
II.1.3.1. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN)	21
II.1.3.2. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM	22
II.1.3.3. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM	22
II.1.3.4. Le couplage CLHP-CPG-SM	23

II.1.3.5. Le couplage CLHP-RMN <sup>1</sup> H	23
II.2. Identification des constituants après purification : Voie B	24
II.3. Analyse par RMN du <sup>13</sup> C sans séparation préalable : Voie C	25
II.3.1. Intérêt de la RMN du <sup>13</sup> C pour l'analyse des mélanges complexes	26
II.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du <sup>13</sup> C	27
II.3.2.1. Observation et individualisation des signaux	27
II.3.2.2. Attribution des signaux dans le spectre d'un mélange complexe	29
II.3.3. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse	30
II.3.3.1. Application à l'analyse d'huiles essentielles ainsi qu'à d'autres mélanges naturels	32
II.3.3.2. Caractérisation des huiles essentielles	32
II.3.3.3. Identification des stéréoisomères	33
II.3.3.4. Identification des molécules thermosensibles	33
II.3.3.5. Étude de la variabilité chimique	33
II.3.3.6. Analyse structurale de nouvelles molécules	34
<b>Chapitre III : POUVOIR ANTIMICROBIEN DES HUILES ESSENTIELLES</b>	<b>36</b>
I. Les antibiotiques	36
I.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques	36
I.2. Les cibles bactériennes des antibiotiques	36
II. La résistance aux antibiotiques	37
II.1. La résistance naturelle	37
II.2. La résistance acquise	37
II.3. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques	37
II.4. Les mécanismes de résistance	38
III. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance	38
IV. Les huiles essentielles	39
IV.1. Définition	39
IV.2. Les activités biologiques des huiles essentielles	39
IV.3. Les activités antibactériennes des huiles essentielles	40
IV.4. Les constituants des huiles essentielles	41
IV.5. Mode d'action des huiles essentielles sur les microorganismes	41
IV.5.1. Mode d'action antibactérien	41
IV.5.2. Mode d'action antifongique	43

<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>45</b>
I. Matériel végétal et extraction des huiles essentielles	<b>46</b>
I.1. Matériel végétal	<b>46</b>
I.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	<b>47</b>
II. Analyse des huiles essentielles	<b>49</b>
II.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	<b>49</b>
II.2. Spectrométrie de Masse (SM)	<b>49</b>
II.3. Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 (RMN <sup>13</sup> C)	<b>51</b>
II.4. Chromatographie sur colonne de silice	<b>52</b>
III. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	<b>52</b>
III.1. Introduction	<b>52</b>
III.2 Souches bactériennes et fongiques testées	<b>53</b>
III.3. Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	<b>54</b>
III.3.1. Méthode de diffusion sur disque	<b>54</b>
III.3.2. Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	<b>55</b>
III.3.3. Etude du pouvoir antifongique	<b>55</b>
IV. Analyse statistique	<b>56</b>
<b>PARTIE RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>56</b>
<b>I. <i>Warionia saharae</i></b>	<b>58</b>
I.1. Rendements en huile essentielles des différentes stations	<b>58</b>
I.2. Analyse des huiles essentielles de <i>Warionia saharae</i>	<b>59</b>
I.2.1. Analyse détaillée de l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i>	<b>59</b>
I.2.2. Etude de la variabilité intraspécifique de l'huile essentielle de <i>W. saharae</i>	<b>64</b>
<b>II. <i>Pulicaria mauritanica</i></b>	<b>69</b>
II.1. Rendements en huiles essentielles des différentes parties de <i>P. mauritanica</i>	<b>70</b>
II.2. Analyse des huiles essentielles de <i>Pulicaria mauritanica</i>	<b>71</b>
II.2.1. Analyse des huiles essentielles des parties aériennes de <i>Pulicaria mauritanica</i>	<b>71</b>
II.2.1.1. Analyse détaillée de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>P. mauritanica</i>	<b>72</b>
II.2.1.2. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle de <i>Pulicaria mauritanica</i>	<b>76</b>
II.2.1.3. Composition chimique de l'huile essentielle au cours du cycle de développement de cette espèce végétale	<b>78</b>
II.2.1.4. Composition des huiles essentielles obtenues à partir de différentes parties du végétal : fleurs et feuilles	<b>79</b>

II.2.2. Analyse des huiles essentielles des racines de <i>Pulicaria mauritanica</i>	82
II.2.2.1. Analyse directe de l'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i>	82
II.2.2.2. Etude détaillée de l'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i> après fractionnement	85
II.2.2.2.1. Etude de la fraction hydrocarbonée F1	87
II.2.2.2.2. Etude des fractions oxygénées F2 à F6	87
II.2.2.2.3. Identification des molécules absentes de la bibliothèque de spectres de RMN du <sup>13</sup> C du laboratoire et analyse structurale des composés non identifiés	88
II.2.2.3. Bilan d'analyse des huiles essentielles des racines de <i>P. mauritanica</i>	95
II.2.2.4. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i>	100
III. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des différentes plantes	101
III.1. Détermination de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)	101
III.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de contact direct en milieu gélosé	102
III.3. Détermination de l'activité antifongique des huiles essentielles	104
<b>CONCLUSION</b>	<b>106</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>111</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>127</b>
<b>PUBLICATIONS</b>	

## Table des illustrations

### Liste des tableaux

<b>Tableau (1) :</b> Lieux des prélèvements des plantes, situation géographique et bioclimat des différentes stations d'étude	<b>47</b>
<b>Tableau (2) :</b> Les différentes souches microbiennes testées	<b>53</b>
<b>Tableau (3) :</b> Rendement (%) en huiles essentielles de <i>Warionia saharae</i> des différentes stations	<b>58</b>
<b>Tableau (4) :</b> Composés identifiés par RMN <sup>13</sup> C dans l'huile essentielle de <i>W. saharae</i>	<b>60</b>
<b>Tableau(5) :</b> Composition chimique de l'huile essentielle d'un échantillon de <i>Warionia saharae</i>	<b>63</b>
<b>Tableau (6) :</b> Composés majoritaires identifiés dans les 16 échantillons d'huile essentielle de <i>W. saharae</i>	<b>65</b>
<b>Tableau (7) :</b> Composés majoritaires dans l'huile essentielle de <i>W. saharae</i> des différentes régions	<b>65</b>
<b>Tableau (8) :</b> Pourcentages moyens des constituants des huiles essentielles de <i>W. saharae</i> dans les groupes GI et GII (S-GII A, S-GII B)	<b>67</b>
<b>Tableau (9) :</b> Rendements (%) en huiles essentielles de la partie aérienne de <i>Pulicaria mauritanica</i> des différentes stations en novembre 2010	<b>70</b>
<b>Tableau (10) :</b> Rendements (%) en huiles essentielles de la partie aérienne de <i>Pulicaria mauritanica</i> des différentes stations en mai 2011	<b>70</b>
<b>Tableau (11) :</b> Rendements (%) en huiles essentielles des racines de <i>Pulicaria mauritanica</i> des différentes stations en novembre 2011	<b>71</b>
<b>Tableau (12) :</b> Composés identifiés par RMN <sup>13</sup> C dans l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>P. mauritanica</i>	<b>73</b>
<b>Tableau (13) :</b> Composition chimique de l'huile essentielle d'un échantillon <i>P. mauritanica</i>	<b>75</b>
<b>Tableau (14) :</b> Composés majoritaires identifiés dans les 36 échantillons d'huile essentielle de <i>Pulicaria mauritanica</i>	<b>77</b>
<b>Tableau (15) :</b> Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>P. mauritanica</i> au cours du cycle de développement	<b>80</b>
<b>Tableau (16) :</b> Composition Chimique des huiles essentielles des feuilles et des fleurs de <i>P. mauritanica</i>	<b>81</b>
<b>Tableau (17) :</b> Composition chimique de l'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i> après analyse par RMN <sup>13</sup> C et CPG/SM	<b>83</b>

<b>Tableau (18) :</b> Données spectrales de la modhéphane-3-one	<b>94</b>
<b>Tableau (19) :</b> Coefficients de réponse calculés (FRs) pour les composés de référence	<b>96</b>
<b>Tableau (20) :</b> Composés chimiques de l'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i>	<b>98</b>
<b>Tableau (21) :</b> Composés majoritaires identifiés dans les 8 échantillons d'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i>	<b>100</b>
<b>Tableau (22) :</b> Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles relatives aux différentes souches	<b>101</b>
<b>Tableau (23) :</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en huile essentielle de la partie aérienne de <i>P. mauritanica</i> relatives aux souches microbiennes testées	<b>103</b>
<b>Tableau (24) :</b> Activité antifongique des huiles essentielles de <i>P. mauritanica</i> et <i>W. saharae</i>	<b>104</b>

## Liste des figures

<b>Figure (1) :</b> Schéma du montage d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes	<b>16</b>
<b>Figure (2) :</b> Méthodes d'analyse d'un mélange complexe	<b>17</b>
<b>Figure (3) :</b> Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du $^{13}\text{C}$	<b>31</b>
<b>Figure (4) :</b> Mode d'action des antibiotiques	<b>36</b>
<b>Figure (5) :</b> Situation géographique des lieux des prélèvements	<b>48</b>
<b>Figure (6) :</b> Structure des composés identifiés par RMN $^{13}\text{C}$ dans l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i>	<b>61</b>
<b>Figure (7) :</b> Composés identifiés par CPG/SM dans l'huile essentielle de <i>W. saharae</i>	<b>62</b>
<b>Figure (8) :</b> Analyse en composante principale des compositions chimiques des huiles essentielles de <i>W. saharae</i>	<b>66</b>
<b>Figure (9) :</b> Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse de Cluster de 16 échantillons d'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i>	<b>67</b>
<b>Figure (10) :</b> Structure des composés identifiés par RMN $^{13}\text{C}$ dans l'huile essentielle de <i>P. mauritanica</i>	<b>73</b>
<b>Figure (11) :</b> Composés identifiés par CPG/SM dans l'huile essentielle de <i>P. mauritanica</i>	<b>74</b>
<b>Figure (12) :</b> Structure des composés identifiés par RMN $^{13}\text{C}$ et par CPG/SM en analysant l'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i>	<b>84</b>
<b>Figure (13) :</b> Schéma de fractionnement de l'huile essentielle des racines de <i>P. mauritanica</i>	<b>86</b>
<b>Figure (14) :</b> Structure et déplacements chimiques des carbones de l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle <b>31</b>	<b>88</b>
<b>Figure (15) :</b> Structures et déplacements chimiques des carbones des composés 6-méthoxythymyle isobutyrate <b>31</b> et 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle isobutyrate <b>32</b>	<b>89</b>
<b>Figure (16) :</b> Structures et déplacements chimiques des carbones du composé 10-isobutyroxy-8,9-déhydrothymyle isobutyrate <b>34</b>	<b>90</b>
<b>Figure (17) :</b> Structure et déplacements chimiques de l'isobutyrate 10-isobutyryloxy thymyle <b>33</b>	<b>91</b>
<b>Figure (18) :</b> Déplacements chimiques du 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle isobutyrate <b>36</b>	<b>92</b>
<b>Figure (19) :</b> Déplacements chimiques de 10-(2-méthylbutyloxy)-8,9-époxythymyle isobutyrate <b>37</b>	<b>92</b>
<b>Figure (20) :</b> Structure de 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol <b>38</b>	<b>93</b>

## **Liste des photos**

<b>Photo 1 :</b> <i>Warionia saharae</i> : 1, Plante entière	<b>08</b>
<b>Photo 2 :</b> <i>Warionia saharae</i> : 2, Inflorescence	<b>08</b>
<b>Photo 3 :</b> <i>Pulicaria mauritanica</i>	<b>10</b>

## **Liste des annexes**

<b>Annexe (1) :</b> Composition chimique des 16 échantillons de <i>Warionia saharae</i>	
<b>Annexe (2) :</b> Composition chimique des huiles essentielles des 36 échantillons de <i>P. mauritanica</i> récoltée dans les trois stations	
<b>Annexe (3) :</b> Composition chimique des huiles essentielles des 8 échantillons des racines de <i>P. mauritanica</i> récoltée dans les deux stations	
<b>Annexe 4 :</b> Spectre de masse de 6-méthoxythymyle isobutyrate	<b>31</b>
<b>Annexe 5 :</b> Spectre de masse de 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle isobutyrate	<b>32</b>
<b>Annexe 6 :</b> Spectre de masse de 10-isobutyroxy-8,9-déhydrothymyle isobutyrate	<b>34</b>
<b>Annexe 7 :</b> Spectre de masse de 10-isobutyroxy thymyle isobutyrate	<b>33</b>
<b>Annexe 8 :</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C de l'huile essentielle de <i>W. saharae</i>	
<b>Annexe 9 :</b> Spectre RMN <sup>13</sup> C de l'huile essentielle des parties aériennes de <i>P. mauritanica</i>	

## Liste des abréviations

**CC** : Chromatographie sur Colonne

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**CLHP-CPG-SM** : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Chromatographie en Phase Gazeuse et à la Spectrométrie de Masse

**CLHP-SM** : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**COSY** : Correlation Spectroscopy (corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  simple liaison)

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse

**CPG(Ir)** : Chromatographie en Phase Gazeuse (associée aux Indices de rétention)

**CPG-IRTF** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

**CPG-IRTF-SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier et Spectrométrie de Masse

**CPGMD** : Chromatographie en Phase Gazeuse MultiDimensionnelle

**CPG-SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

**DEPT** : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

**FID** : Détecteur à Ionisation de Flamme

**HMBC** : Heteronuclear Multiple Bonds Correlation (corrélation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  longue distance, deux ou trois liaisons)

**HSQC** : Heteronuclear Simple Quantum Correlation (corrélation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  simple liaisons)

**IRTF** : Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier

**ppm** : Partie par million

**RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$**  : Résonance Magnétique Nucléaire du Proton / du Carbone

**RMN (1D et 2D)** : Résonance Magnétique Nucléaire (mono- et bidimensionnelle)

**SM(ICN)** : Spectrométrie de Masse (mode Ionisation Chimique Négative)

**SM(ICP)** : Spectrométrie de Masse (mode Ionisation Chimique Positive)

**SM(IE)** : Spectrométrie de Masse (mode Impact Electronique)

$^{\circ}\text{C}$  : Degré Celsius

**g** : Gramme

**h** : Heure

**Ik** : Indice de Kováts

**Ir** : Indice de rétention

**IE** : Impact électronique

**L** : Litre

**m** : Mètre

**ml** : Millilitre

**μl** : Microlitre

**μg** : Microgramme

**UV** : Ultra violet

**W** : Poids

**%** : Pourcentage

**δ** : Déplacement chimique

**δ<sup>1</sup>H** : Déplacement chimique RMN <sup>1</sup>H

**δ<sup>13</sup>C** : Déplacement chimique RMN <sup>13</sup>C

**Δδ** : Variation de déplacement chimique

# **INTRODUCTION**

Pour la grande majorité des populations rurales des pays en développement, les plantes médicinales ont toujours constitué des ressources précieuses. Ainsi, la médecine traditionnelle occupe une place importante dans la culture asiatique et africaine. Le secteur des plantes à parfum aromatiques et médicinales connaît dans le monde, une nette croissance. Il touche majoritairement des marchés tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agroalimentaire.

Ces plantes aromatiques sont, donc, à l'origine de produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation.

Les techniques d'analyse à la disposition de l'expérimentateur d'aujourd'hui permettent, dans la grande majorité des cas, de réaliser ce travail en routine. Cependant, l'identification de certains constituants est parfois délicate et l'utilisation de plusieurs méthodes d'analyse complémentaires s'avère non seulement utile mais nécessaire. Les huiles essentielles, préparées par hydrodistillation du matériel végétal, en sont une bonne illustration.

Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles et de leurs constituants est l'une des activités biologiques les plus étudiées actuellement vu l'apparition et l'extension rapide du phénomène de résistance aux agents microbiens classiques qui constitue un problème majeur de santé public même dans les pays les plus développés. Le principal déterminant de l'apparition de cette résistance est sans aucun doute, la pression de sélection des antibiotiques et des antifongiques à laquelle les populations microbiennes sont soumises (Soussy, 1997).

De ce fait, il semble nécessaire de procéder à la recherche de nouveaux principes dans les produits naturels, utilisés traditionnellement de manière empirique, parmi lesquels les huiles essentielles. En effet, ces métabolites semblent présenter des activités antibactériennes assez prometteuses vu leur complexité résultant du nombre important de leurs constituants très variés. Cette diversité structurale de leurs molécules constitutives leur confère des mécanismes d'actions antimicrobiennes multiples (Cowan, 1999 ; Burt, 2004).

L'Algérie est un pays riche en plantes aromatiques et médicinales sauvages susceptibles d'être utilisées dans différents domaines, pour leurs propriétés thérapeutiques, odorantes et organoleptiques.

En collaboration avec l'équipe « Chimie & Biomasse » de l'université de Corse, nous avons contribué à la valorisation des espèces végétales aromatiques poussant à l'état spontané dans la région de Nâama (Ouest de l'Algérie) qui a un climat continental aride avec des moyennes de -10°C

l'hiver et de plus de 45°C l'été, en procédant à la caractérisation chimique et à l'étude du pouvoir antimicrobien de leurs huiles essentielles. Notre choix s'est porté sur deux plantes, à savoir : *Warionia saharae* Benth. & Hook. et *Pulicaria mauritanica* Coss., qui font partie intégrante de l'arsenal thérapeutique traditionnel de la population locale. Nous avons ainsi divisé notre travail en trois parties :

- La première partie est une revue bibliographique et comporte trois chapitres.

Le premier chapitre est consacré aux deux espèces végétales : *Warionia saharae* Benth. & Hook. et *Pulicaria mauritanica* Coss., en incluant une présentation botanique de la famille des astéracées ainsi que celle des espèces végétales étudiées. Ce chapitre englobe également les propriétés thérapeutiques et les travaux déjà réalisés sur ces plantes.

Dans le deuxième chapitre, nous avons présenté les principales techniques utilisées pour l'analyse des huiles essentielles et nous mettrons en évidence, leurs avantages et leurs limites. Nous présenterons également la méthode d'analyse par RMN du carbone 13 développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse.

Le dernier chapitre concerne le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles. Nous avons présenté les agents antibactériens classiques, leur mécanisme d'action et le phénomène de résistance. Ensuite, nous avons évoqué l'intérêt que suscitent les huiles essentielles autant qu'agent antimicrobien en citant leurs applications dans divers secteurs.

- La deuxième partie comporte la partie expérimentale qui se déroule en deux axes :
  - Dans le premier axe, nous avons réalisé l'échantillonnage des plantes et l'extraction des huiles essentielles, ainsi que leur caractérisation en combinant plusieurs méthodes d'analyse chromatographiques et spectroscopiques (Chromatographie en Phase Gazeuse, Chromatographie sur colonne de silice, Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse et la Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13 pour l'analyse des mélanges).
  - Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Warionia saharae* Benth. & Hook. et *Pulicaria mauritanica* Coss. selon deux méthodes :
    - ✓ Méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme) ;
    - ✓ Détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI) par la méthode de contact direct.

- Enfin, la troisième partie est consacrée aux résultats obtenus et la discussion concernant la caractérisation chimique des huiles essentielles des deux plantes et leur pouvoir antimicrobien.

**PARTIE**  
**SYNTHÈSE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE DES PLANTES ETUDIEES

### I. Famille des Astéracées

#### I.1. Généralités

C'est la plus vaste famille de la division des spermatophytes avec près de 17 tribus, 1000 genres et au moins 25 000 espèces répandues à travers le monde (Gaussen et Leroy, 1982 ; Guignard, 1994). Les composées (astéracées) connaissent une distribution géographique mondiale, à l'exception de l'Antarctique. Elles s'acclimatent bien aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale (Guignard, 1994).

En Algérie, elle compte environ 109 genres et plus de 408 espèces (De-Eknamkul et Potduang, 2003).

#### I.2. Description botanique

Les composées sont principalement des herbes, vivaces ou non, mais aussi des arbustes ou sous-arbrisseaux, parfois des arbres, rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou encore des épiphytes. Les feuilles sont le plus souvent alternes mais aussi opposées ou radiales, simples, ex-stipulées (Gaussen et Leroy, 1982). Les fleurs des composées sont toujours groupées en une inflorescence (groupe de fleurs sur la même tige) appelée tête ou capitule qui fonctionne comme une fleur unique. Chez la moitié des espèces, les petites fleurs centrales sont tubuleuses, en forme de minuscules disques, alors que celles de la périphérie ont des corolles en forme de languettes évasées vers l'extérieur, comme autant de pétales, qui attirent les insectes pollinisateurs. Les corolles sont entourées à la base de bractées. Le calice de chacune des fleurs du capitule est formé d'écailles ou de longs poils favorisant la dispersion des graines. Chez le pissenlit, le pappus se compose de fines aigrettes qui permettent au fruit de flotter dans la brise (Gaussen et Leroy, 1982 ; Heymann et *al.*, 1994 ; Guignard, 1994).

Les pétales des capitules sont soudés à la base en une corolle tubulaire. Les anthères se rejoignent pour former un tube que traverse le style (partie médiane du pistil entre l'ovaire et le stigmate). Les anthères déversent le pollen dans le tube et le style s'allonge pour pousser le pollen hors du tube pollinique et le rendre accessible aux insectes pollinisateurs ou faciliter sa dispersion par le vent. Le stigmate (partie supérieure du pistil recevant le pollen) se rétracte après l'allongement du style pour éviter l'autopollinisation, ce qui arrive parfois lorsque le stigmate s'incurve dans le tube pollinique. Après la fécondation, le pistil portant l'ovaire de la fleur et d'autres éléments floraux se développe pour constituer un fruit à enveloppe dure et à graine unique (Gaussen et Leroy, 1982 ; Heymann et *al.*, 1994 ; Guignard, 1994).

## II. Le genre *Warionia*

### II.1. Description botanique

Le genre monotypique *Warionia* appartient à la famille des Astéracées (Composées). Elle a été incluse dans la sous-famille des Cichorioideae par Bremer en 1994 (Kilian et *al.*, 2009) et a été affectée à la tribu de Cichorieae et la sous-tribu des Warioniinae par Katinas et *al.* en 2008. *Warionia saharae* Benth. & Hook. (Photo 1 et 2), est une plante endémique du sud est au nord ouest du Maroc et de l'Algérie (Kilian et *al.*, 2009). C'est un arbuste à tronc subéreux avec des tiges courtes. C'est une plante aromatique ressemblant au chardon et contenant un latex blanc. Les feuilles peu charnues sont alternes, subsessiles, sinuées-pennatifides à lobes triangulaires et érodés-dentés. Les capitules sont homogames, terminaux et grands (5-6 cm de large et 3-4 cm de hauteur) à bractées très nombreuses, larges et coriaces. Les fleurs sont jaunes à corolle tubuleuse, réceptacle commun, alvéolé et glabre ; involucre à bractées vertes et violettes aux sommets. Les anthères sont caduques portant des styles recouverts de poils aigus sur sa partie dorsale, un peu au-dessous de leur ramification (Quézel et Santa, 1963 ; Audissou, 1999 ; Katinas et *al.*, 2008).

### II.2. Systématique de l'espèce *Warionia saharae* :

D'après Quézel et Santa (1963) ; Guignard et Dupont (2007), la classification qu'occupe *Warionia saharae* est la suivante :

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées

Genre : *Warionia*

Espèce : *Warionia saharae* Benth. & Hook.



**Photo (1) : *Warionia saharae* : 1, Plante entière (Région d'Aïn Ourka)**



**Photo (2) : *Warionia saharae* : 2, Inflorescence (Katinas et al., 2008)**

### II.3. Propriétés thérapeutiques

Cette espèce connue sous le nom vernaculaire de "afessas" et de "Kabar", est considérée comme une plante médicinale (Watillon et al., 1987). La décoction de ses feuilles séchées est utilisée contre des troubles gastro-intestinaux et des crises d'épilepsie (Bellakhdar et al., 1986).

Dans la médecine traditionnelle marocaine, les feuilles de cette espèce végétale sont utilisées pour traiter des maladies inflammatoires, comme la polyarthrite rhumatoïde, l'inflammation de l'utérus, le rhume, la jaunisse et les douleurs cardiaques (El Rhaffari et Zaid, 2002).

Selon une étude réalisée par Hilmi et al. en 2003, le fractionnement de l'extrait méthanolique des feuilles de *W. saharae* a conduit à l'isolement de deux nouvelles lactones sesquiterpéniques de type guaianolide. Ces composés ont montré une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses KB avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre de 2,6 µg/ml à 3,6 µg/ml.

### II.4. Etude bibliographique

La caractérisation des huiles essentielles de *W. saharae* récoltée dans différentes régions du sud du Maroc a fait l'objet de quelques travaux. Ces huiles essentielles sont dominées par des sesquiterpènes oxygénés.

Les premiers travaux ont été réalisés par Ramaut et al. en 1985. Ces auteurs ont pu isolé et identifié trois principaux constituants, à savoir :  $\beta$ -eudesmol (42,25%), nérolidol (17,26%) et le linalol (8,63%). Ces trois composés sont les constituants les plus abondants dans l'huile essentielle de *W. saharae* collectées dans différentes régions au Maroc et rapportés dans la littérature depuis ce temps. En revanche, la présence de composants mineurs varie considérablement d'un échantillon à l'autre.

- La composition chimique d'un échantillon d'huile essentielle de cette espèce récoltée dans la région de Tata, au sud du Maroc a été caractérisée par une forte teneur en  $\beta$ -eudesmol (52,7%), suivi par (*E*)-nérolidol (17,4%). Par contre, une plus faible teneur a été observée pour le linalol (5,1%). Ces auteurs ont identifié diverses sesquiterpènes habituellement trouvés dans les huiles essentielles, parmi eux, le guaiol (2,4%) (Essaqui et al., 2007).
- Sept échantillons d'huile, isolés à partir de plantes récoltées dans différentes régions au Maroc ont été analysés par CPG/SM (Znini et al., 2011, 2013a). L'étude de la composition chimique de ces huiles révèle également la prédominance des mêmes composés :  $\beta$ -eudesmol (de 30,0% à 45,6%), (*E*)-nérolidol (8,6% à 31,5%) et le linalol (12,5% à 19,3%). Elles renferment aussi des quantités appréciables en d'autres composés, à savoir : le géraniol (1,4 à 3,9%) et l' $\alpha$ -terpinéol (2,1-3,4%). Ces auteurs mentionnent aussi la présence en faibles teneurs des constituants suivants : agarospirol (jusqu'à 1,9%), carvacrol (jusqu'à 1,4%), (*E*)- $\beta$ -damascénone (jusqu'à 0,3%) et (*E*)-anéthol (jusqu'à 0,3%).
- Un autre échantillon d'huile essentielle de *W. saharae* récoltée à Errachidia (Maroc) contient le  $\beta$ -eudesmol (23,74%), le (*E*)-nérolidol (17,95%), le linalol (16,79%) ainsi que le 1,8-cinéole (6,12%), le *p*-cymène (3,8%), le terpinèn-4-ol (3,4%), l' $\alpha$ -fenchol (2,6%) et l'oxyde de caryophyllène (1,9%). Ces auteurs signalent la présence du 3-phénylpropionate ainsi que le 8-fluorooctanoate (Sellam et al., 2012).
- Un deuxième échantillon d'huile de provenance de la région de Tata (Maroc) est caractérisé par une prédominance de  $\beta$ -eudesmol (38,12%) et de (*E*)-nérolidol (25,95%). Contrairement aux rapports précédents, la présence de linalol n'a pas été mentionné par contre l'acétate de linalyl est présent avec un pourcentage de 1,7%. Par ailleurs, un troisième composé  $\delta$ -sélinène (5,4%) est identifié en quantités appréciables dans cette huile, suivi étonnamment d'un dérivé de l'hexasiloxane (4,6%) (Amezouar et al., 2012).
- Enfin, l'huile essentielle de *W. saharae* récoltée en Algérie a fait l'objet d'une seule étude. L'analyse chimique par CPG/SM de cette huile a révélé l'existence d'une composition chimique qui diffère radicalement de celles mentionnées précédemment. Les principaux composés sont :  $\alpha$ -caryophyllène (33,65%),  $\delta$ -cadinène (27,93%),  $\beta$ -guaiène (6,27%), caryolan-1-ol (5,31%) et  $\gamma$ -eudesmol (2,83%) (Belboukhari et al., 2008).

### III. Le genre *Pulicaria*

#### III.1. Description botanique

Le genre *Pulicaria* appartient à la famille des composées, qui comprend 100 espèces poussant à l'état spontané en Europe, en Afrique du nord, en particulier autour de la méditerranée et en Asie (Williams et *al.*, 2003).

Les individus du genre *Pulicaria* comportent des capitules hétérogames et multiflores. Les fleurs du rayon ligulées sont à ligules soit, bien marquées et étalées, soit dressées et dépassant à peine l'involucre (parfois de 1-2 mm seulement). Les fleurs du disque sont tubuleuses et hermaphrodites. Les fleurs du genre *Pulicaria* sont jaunes et l'involucre présente des bractées, qui sont généralement étroites, les extérieures sont courtes ou foliacées et les intérieures sont parfois scarieuses. Le réceptacle plan est nu et à épine alvéolé. Les fleurs sont jaunes. Les akènes sont cylindriques ou comprimés, sans côtes ou à 4 côtes (Quézel et Santa, 1963).

En Algérie, ce genre regroupe les espèces de *Pulicaria* suivantes : *P. crispa* (Forsk.) Benth. et Hook ; *P. laciniata* (Coss. et Kral.) Thell. ; *P. dysenterica* (L.) Gaertn. ; *P. odora* (L.) Rchb.; *P. mauritanica* Coss. ; *P. filaginoides* Pomel ; *P. sicula* p.p. ; *P. arabica* (L.) Casso. ; *P. sicula* (L.) Moris ; *P. vulgaris* Gaertn. ; *P. undulata* (L.) DC. ; *P. lothei* M. ; *P. voiskonskyana* M..

*Pulicaria mauritanica* Coss. (Photo 3), est une espèce endémique au Maroc et en Algérie. C'est une espèce herbacée très odorante à odeur camphrée (Francisco-Ortega et *al.*, 2001). Elle est velue ou laineuse avec des feuilles radiales plus petites (5-6 cm). Les tiges sont dressées et rameuses, portant des feuilles à bords ondulées. Les capitules solitaires sont fixés par de longs pédoncules épaissis au sommet. Les akènes sont oblongs, orangés, brillants et à côtes blanches et marquées (Quézel et Santa, 1963).



**Photo (3) : *Pulicaria mauritanica*  
(Région d'Aïn Sefra)**

### III.2. Systématique de l'espèce *Pulicaria mauritanica*

D'après Quézel et Santa (1963) ; Guignard et Dupont (2007), la classification qu'occupe *Pulicaria mauritanica* Coss. est la suivante :

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Astéridées

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées

Genre : *Pulicaria*

Espèce : *Pulicaria mauritanica* Coss.

### III.3. Propriétés thérapeutiques

Certaines espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter l'inflammation, les douleurs dorsales, les diarrhées, les troubles intestinaux, la dysenterie, les douleurs menstruelles, les spasmes, la fièvre et elles sont données aux femmes après l'accouchement (Williams et al., 2000 ; Awadh Ali et al., 2001 ; Nickavar et Mojab, 2003).

*Pulicaria mauritanica* Coss. connue sous le nom vernaculaire de « mariwa », est considérée comme une plante médicinale. En effet, dans la région de Nâama, elle est utilisée dans le traitement des troubles intestinaux, des maux de tête par fumigation et elle est donnée aux femmes après l'accouchement.

Dans la médecine traditionnelle marocaine, cette plante est connue sous le nom « Ifanzi oudaden », elle est employée pour le traitement de diverses inflammations. Elle est consommée sous forme de tisane et également utilisée comme condiment pour la préparation des plats culinaires (Cristofari et al., 2011).

### III.4. Etude bibliographique

Les études phytochimiques du genre *Pulicaria* ont fait l'objet de plusieurs travaux et rapportés par Liu et al. en 2010. Ils révèlent que les espèces de *Pulicaria* contiennent une grande variété de composés, tels que les dérivés phénoliques, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes, les stéroïdes et les flavonoïdes. Des activités biologiques diverses ont été rapportées pour certaines espèces de *Pulicaria*, comme l'activité cytotoxique de *P. crispa* et *P. orientalis* (Al-Yahya et al., 1988 ; Awadh et al., 2001), l'activité antibactérienne de *P. undulata* et *P. dysenterica* (El-Kamali et al., 1998 ; Bahman et al., 2002), l'activité antispasmodique de *P. glutinosa* (Tanira et al., 1996) et l'effet antihistaminique de *P. dysenterica* (Mahfouz et al., 1973).

Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et/ou des divers extraits de plusieurs espèces de *Pulicaria* ont été testées (Nickavar et al., 2003 ; Hanbali et al., 2005 ; Ezoubeiri et al., 2005).

La caractérisation des huiles essentielles du genre *Pulicaria* a fait l'objet de plusieurs travaux, permettant d'avancer l'existence d'une variabilité chimique de cette huile essentielle (Weyerstahl et al., 1998 ; Hanbali et al., 2005 ; El-Kamali et al., 2009 ; El Abed et al., 2010, Ravandeh et al., 2011 ; Cristofari et al., 2011).

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *P. gnaphalodes* récolté au nord de Téhéran (Iran) effectué par Weyerstahl et al. en 1998, leur a permis d'obtenir des teneurs élevées en  $\alpha$ -pinène (34,1%), suivi de 1,8-cinéole (11,9%).

Par ailleurs, Hanbali et al. en 2005 rapportent que l'huile essentielle de *P. odora* poussant à l'état spontané au Maroc contient une forte teneur en thymol (47,8%) et en isobutyrate (30,0%).

En 2010, El Abed et al., ont étudié la composition chimique des huiles essentielles de différentes parties de l'espèce *P. arabica* poussant à l'état spontané au sud de la Tunisie. Ils ont trouvé que l'huile essentielle des fleurs est riche en  $\gamma$ -cadinène (11,75%), en  $\delta$ -cadinène (9,55%) et en  $\alpha$ -cadinol (8,59%). Par contre, les composés majoritaires de l'huile essentielle des tiges sont : le thymol (15,22%),  $\delta$ -cadinène (9,12%) et  $\tau$ -cadinol (6,65%). Alors que l'huile essentielle des feuilles est caractérisée par des teneurs élevées en  $\alpha$ -cadinol (10,31%), en  $\tau$ -cadinol (8,04%) et en  $\delta$ -cadinène (7,89%).

D'autre part, El-Kamali et al. en 2009 ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle de *P. undulata*, plante endémique au Soudan. La (+) carvotanacétone (55,9%) est le composé majoritaire, suivi par le  $\beta$ -linalol (4,6%) et le thymol (3,0%).

En outre, Ravandeh et al. en 2011, rapportent que l'huile essentielle de *P. undulata* provenant d'Iran renferment les composés majoritaires suivants : terpinèn-4-ol (20,12%), cis-calaménène (13,37%), junipène (8,66%), cis-hydrate de sabinène (8,29%),  $\gamma$ -terpinène (7,00%), linalol (5,60%) et  $\alpha$ -terpinène (4,02%).

La caractérisation de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pulicaria mauritanica* a fait l'objet de très peu d'étude. En effet, en 1949, Gattefossé and Igolen mentionnent que l'huile essentielle de *Pulicaria mauritanica* est très riche en carvotanacétone de l'ordre de 81,0%. De même, l'analyse chimique de cette espèce végétale récoltée dans 4 stations différentes au Maroc, révèle une composition chimique homogène qualitativement et quantitativement. La carvotanacétone est le composé majoritaire avec des pourcentages variant entre 79,99 et 92,13%. D'autres composés sont également présents en quantités appréciables, à savoir : le linalol (0,36-2,10%) et le carvacrol (0,41-2,05%) (Cristofari et al., 2011). Ces auteurs ont étudié aussi l'activité

antifongique de ces huiles essentielles vis-à-vis de trois champignons phytopathogènes (Znini et *al.*, 2013b).

Pour le meilleur de notre connaissance, aucune étude ne rapporte la composition chimique et l'activité biologique de l'huile essentielle des racines de *Pulicaria mauritanica*.

## **Chapitre II : LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES CONSTITUANTS DANS UN MELANGE NATUREL**

### **I. Techniques d'extraction des constituants dans un mélange naturel**

Les métabolites secondaires constituent un ensemble de molécules majoritairement de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucides, lipides et acides aminés). Parmi les métabolites secondaires, les huiles essentielles sont les plus étudiées et présentent une grande importance commerciale. Il s'agit de mélanges naturels généralement dominés par des composés mono- ou sesquiterpéniques, plus rarement diterpéniques, et parfois par des phénylpropanoïdes. Les huiles essentielles sont très utilisées dans des secteurs assez divers, principalement en parfumerie, en cosmétique et font aussi l'objet d'une consommation importante de la part de l'industrie agroalimentaire où elles sont appréciées pour leurs propriétés organoleptiques.

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles obéissent à des normes comme celle de l'AFNOR NF T 75-006 qui précise que seul l'entraînement à la vapeur, les procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus* et la distillation à sec peuvent produire une huile essentielle. Nous détaillerons les techniques utilisés dans l'extraction des huiles essentielles.

#### **I.1. Techniques de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur**

L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation constituent les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciennes, apportés par les Arabes au IX<sup>ème</sup> siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic (Bruneton, 1993).

Le chauffage permet, dans une première étape de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur, de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Le courant de vapeur ainsi créé permet l'entraînement d'un mélange hétérogène d'eau et de molécules organiques.

L'entraînement à la vapeur constitue la technique la plus utilisée et la plus aisée à mettre en œuvre pour la production des huiles essentielles et elle reste sans doute la plus rentable, l'investissement matériel étant relativement peu important par rapport à celui des autres techniques. Elle peut être utilisée au laboratoire avec un appareil de type Clevenger tout autant qu'à grande échelle (« procédé en continu », « cuve mobile »).

## **I.2. Technique d'extraction par les solvants**

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent également être obtenus par l'extraction liquide-liquide avec des solvants organiques. La mise en œuvre de cette technique est indispensable lorsque les composés ne sont pas extractibles par entraînement à la vapeur en raison de leur faible volatilité ou que le rendement de celui-ci est trop faible.

L'extraction permet non seulement la récupération des composés présents dans l'huile essentielle mais également celle de composés « lourds » qui présentent un intérêt spécifique en fonction de leur structure moléculaire. L'industrie cosmétique et agro-alimentaire différencie les extraits selon le type de solvant utilisé, le type de matière première, etc... (Bruneton, 1993).

## **I.3. Technique d'extraction par des les fluides supercritiques**

L'extraction par les fluides supercritiques s'est considérablement développée ces dernières années et a fait l'objet de très nombreuses publications scientifiques.

Le principal avantage de cette technique réside dans la possibilité de travailler à basse température. Cette méthode d'extraction s'est rapidement imposée pour la récupération des composés thermosensibles à haute valeur ajoutée.

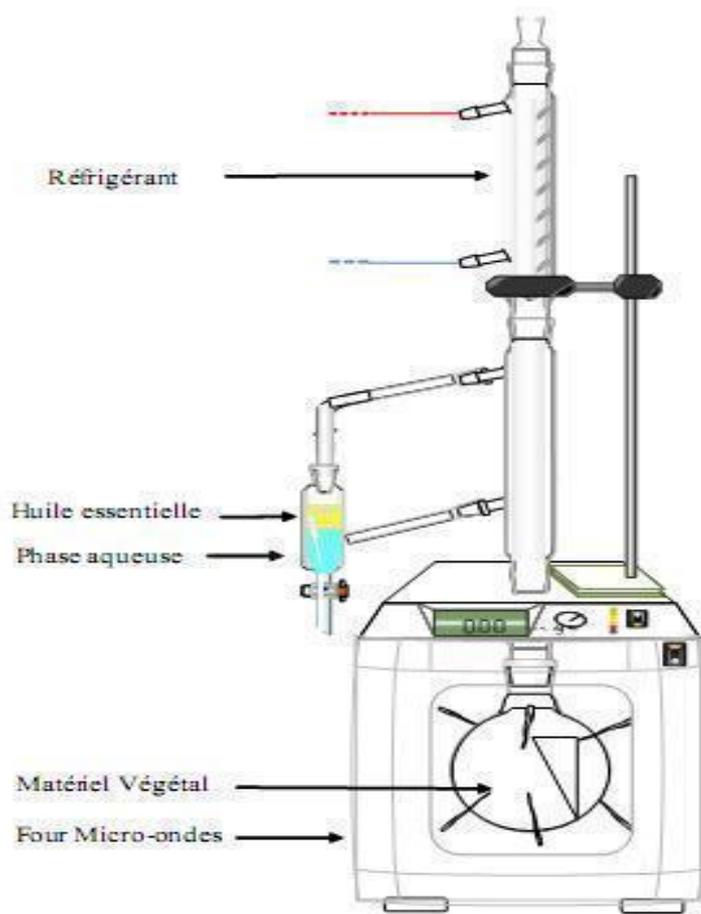
Les fluides supercritiques ont des propriétés différentes à celle d'un gaz ou d'un liquide. Ils ont ainsi une viscosité proche de celle d'un gaz, une densité proche de celle du liquide avec un pouvoir de diffusivité très élevé au fluide liquide, ce qui facilite leur pénétration dans les milieux poreux.

Le point critique est atteint lorsque le changement d'état liquide-gaz n'est plus observé. Le fluide est alors dans un état supercritique intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux. Les conditions d'obtention du CO<sub>2</sub> supercritique sont assez faciles à atteindre (303 K, 73,8 bar) alors que pour l'eau, il faut atteindre une température supérieure à 374,2°C sous une pression supérieure à 218 bar. Pour ces raisons, l'utilisation du CO<sub>2</sub> comme fluide supercritique s'est imposée. La température opératoire permet ainsi d'extraire des constituants sans les dénaturer et en conservant les qualités biologiques et/ou organoleptiques. De plus, l'extrait sera exempt de tout solvant à pression et à température ambiante. Le CO<sub>2</sub> présente aussi les avantages d'être inerte, inodore, non-toxique, non inflammable. Cette technique nécessite un investissement important et ne concerne pour l'instant que des produits spécifiques à très haute valeur ajoutée (Reverchon et De Marco, 2006).

#### I.4. Technique d'extraction assistée par micro-ondes

En 1990, Paré et *al.*, ont déposé un premier brevet européen, sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ils proposaient d'irradier le matériel en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane. Ainsi les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal.

Le procédé d'« hydrodistillation par micro-ondes » est basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique (Figure 1).



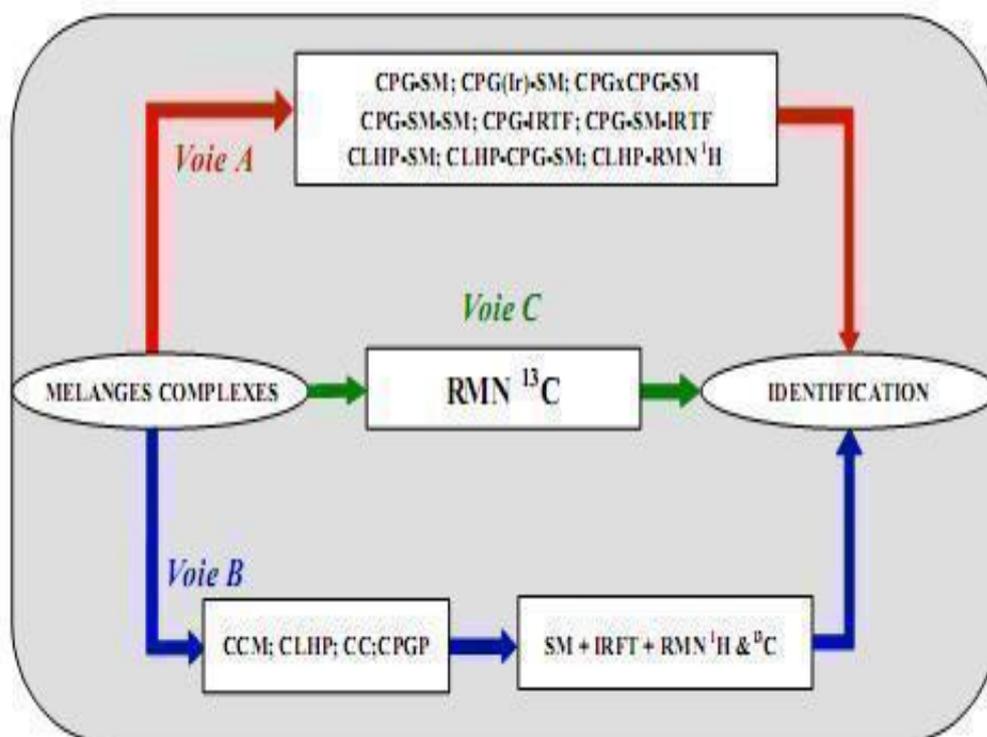
**Figure (1) : Schéma du montage de l'extraction des huiles essentielles par micro-ondes**

## II. Identification des constituants dans un mélange complexe

Les produits naturels issus de la biomasse (huiles essentielles, extraits, résines, etc.) se présentent pratiquement toujours sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines, voire de plus d'une centaine de composés en proportions variables.

Les huiles essentielles, obtenus par entraînement à la vapeur d'eau ou par hydrodistillation de diverses parties des plantes ou par expression à froid de certains fruits (agrumes), renferment principalement des mono-, des sesqui-, parfois des diterpènes ainsi que les phénylpropanoïdes. Les extraits aux solvants organiques peuvent contenir, en plus des terpènes précédents, des triterpènes, des alcaloïdes, des flavonoïdes, des coumarines, des triglycérides ou d'autres composés moins courants.

La valorisation de ces mélanges naturels passe nécessairement par une étape de caractérisation (analyse chimique). L'identification et la quantification des constituants de ces mélanges peuvent être réalisées à l'aide de différentes techniques analytiques en fonction de l'objectif fixé et de la complexité du mélange (Figure 2).



*CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ; SM : Spectrométrie de Masse ; IRTF : Infra-Rouge à Transformée de Fourier ; CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance ; RMN : Résonance Magnétique Nucléaire ; CCM : Chromatographie sur Couche Mince ; CC : Chromatographie sur Colonne*

**Figure (2): Méthodes d'analyse d'un mélange complexe**

## II.1. Analyse par des couplages « en ligne » : Voie A

Cette partie traitera dans un premier temps les différents couplages avec une technique de chromatographie en phase gazeuse et dans un deuxième temps avec une technique de chromatographie en phase liquide.

### II.1.1. Chromatographie en Phase Gazeuse et les indices de rétention

Introduite dans les années 1940, la CPG (chromatographie en phase gazeuse) est une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Elle est utilisée dans le cas des molécules naturellement volatiles, mais aussi dans des molécules qui, par des réactions de dérivatisation (acétylation, silylation), sont rendues volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition (Bielicka-Daszkiewicz et *al.*, 2004 ; Rojas-Escudero et *al.*, 2004). Cette technique de séparation, permet l'individualisation des constituants présents dans les échantillons en quantité inférieure au nanogramme. Elle présente également une bonne adaptabilité, grâce à un grand choix de phases stationnaires, de phases mobiles (hélium, argon, azote, ou encore hydrogène) et de températures (isotherme ou programmée).

Théoriquement, chaque constituant d'un mélange peut être caractérisé par son temps de rétention. Néanmoins celui-ci est fortement dépendant des conditions opératoires ce qui rend l'identification des constituants difficilement réalisable uniquement par CPG sur la base des temps de rétention. Afin d'obtenir des données plus fiables, les constituants d'un mélange sont caractérisés par deux indices de rétention ( $I_r$ ), sur colonnes polaire et apolaire. Ceux-ci sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane linéaires à température constante (indices de Kováts,  $I_k$ ) (Kováts, 1965) ou en programmation de température (indices de rétention,  $I_r$ ) (Van den Dool et Kratz, 1963). Les indices de rétention expérimentaux sont comparés avec ceux de la littérature. Cependant, pour un même composé, il est fréquent de constater les écarts, parfois importants. Ces écarts sont faibles sur colonne apolaire et plus importants sur colonne polaire.

Un composé ne peut donc être identifié uniquement par l'examen de ses indices de rétention sur deux colonnes, sauf dans le cas d'analyses répétitives pour des contrôles de qualité par exemple.

On admet aisément que les indices de rétention ne constituent pas une base suffisante pour l'identification des constituants d'une huile essentielle. C'est pourquoi divers couplages de la CPG avec des techniques spectroscopiques ont été développés, leur utilisation rendant fiable l'identification des composés.

### II.1.2. Quantification par CPG en mettant en œuvre les facteurs de réponse (FR)

La CPG est la méthode de quantification classique des constituants d'une huile essentielle. Les pourcentages relatifs calculés sont utilisés tels quels, bien que Joulain (1994) ait relevé depuis longtemps les abus de la quantification par CPG sans l'ajout d'une référence interne. Dans un souci de fiabilité et de reproductibilité des résultats, notamment pour le contrôle qualité, il apparaît nécessaire d'utiliser des facteurs de réponse (FR). Ces derniers, peuvent être assimilés à des facteurs de correction pour quantifier par CPG des constituants préalablement identifiés et améliorer ainsi la justesse des résultats obtenus (Bicchi *et al.*, 2008).

Les signaux générés en CPG dépendent notamment de la concentration des échantillons et de la structure chimique des molécules (en particulier du nombre d'oxygène en vue de la combustion). Par conséquent, si la réponse des détecteurs aux analytes est différente, un FR doit être appliqué dans le but de normaliser les résultats obtenus. On parle alors de « quantification vraie ». Dans ce cas, la réponse du détecteur à ionisation de flamme par rapport aux constituants d'une huile essentielle doit être vérifiée par une calibration.

Récemment, Costa *et al.* en 2008 ont proposé comme solution de calculer les FR de composés classés par famille (groupe fonctionnel) et par classe (mono- ou sesquiterpène). Les auteurs ont tracé les courbes de calibration en utilisant des composés purs de référence représentatifs de chaque groupe, la fiabilité des résultats augmentant avec le nombre de composés de référence utilisés pour la validation. En utilisant le nonane comme référence interne, les auteurs ont calculé les FR d'oléfines monoterpéniques (moyenne (M): 1,03 ; écart-type (ET):  $\pm 0,01$ ) et sesquiterpéniques (M: 0,98 ; ET:  $\pm 0,03$ ), de cétones (M: 1,03 ; ET:  $\pm 0,01$ ), d'alcools (M: 1,30 ; ET:  $\pm 0,02$ ), d'aldéhydes (M: 1,30 ; ET:  $\pm 0,02$ ) et d'acétate (M: 1,59 ; ET:  $\pm 0,02$ ).

Par ailleurs, pour un composé donné, six paramètres peuvent influencer la valeur de FR d'un chromatographe à l'autre : la phase de la colonne, la température du détecteur, la température de l'injecteur, le diviseur, le rapport quantité d'hydrogène/quantité d'air et le débit d'air. Les FR étant dépendants de l'appareillage utilisé et notamment des paramètres expérimentaux, l'utilisation d'une éventuelle base de données de FR est possible mais nécessite des conditions expérimentales rigoureusement identiques (Cicchetti *et al.*, 2008).

Dans ce contexte, afin de réaliser une « quantification vraie » par CPG des constituants des huiles essentielles, et en utilisant le nonane comme référence interne, on peut ainsi calculer les FR (sur colonne apolaire) des composés en utilisant la formule suivante :

$$\mathbf{FR} = (\mathbf{A}_R \times \mathbf{m}_p) / (\mathbf{A}_C \times \mathbf{m}_R)$$

FR : facteur de réponse ;  $m_p$  : masse pesée d'analyte (mg) ;  $A_R$  : aire du nonane (référence interne) ;  $A_C$  : aire de l'analyte ;  $m_R$  : masse pesée (mg) du nonane (référence interne).

### II.1.3. Couplage d'une technique chromatographique avec une technique spectroscopique

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975. Depuis, cette méthode de couplage n'a cessé d'évoluer et a trouvé de nombreuses applications dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc. (Mc Lafferty, Michnowicz, 1992). Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est aujourd'hui, la technique de référence (Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996). Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont :

- Analyseur quadripolaire :

Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, les potentiels sont réglés de manière telle que seuls les ions d'une fourchette de masses déterminées traversent les barres. Par la suite, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Les détecteurs les plus courants sont les multiplicateurs d'électrons ou de photons. Ils convertissent les impacts ioniques en signaux. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs et dans certains cas des ions négatifs.

- Analyseur à temps de vol

Un spectromètre à temps de vol (TOF, Time Of Flight) est un analyseur dont le principe est extrêmement simple :

-La séparation des ions est fondée sur leur différence de vitesse. En effet tous les ions possèdent la même énergie cinétique à la sortie de la source :  $W = 1/2 mv^2$ , en conséquence les ions les plus légers ont une vitesse plus grande que les ions plus lourds. En réalisant, non pas un faisceau ionique continu, mais un faisceau "pulsé", il sera possible de séparer les ions dans le temps, à condition qu'ils partent tous en même temps de la fente d'entrée du système dispersif.

-La résolution obtenue est meilleure que celle obtenue sur un quadripôle, de l'ordre de 3 000 à 4 000, mais le principal avantage c'est qu'il n'y a aucune limitation en masse. En effet, étant donné qu'aucun champ magnétique ni champ électrique radial n'est utilisé, la masse de l'ion susceptible d'être observée est illimitée.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants

d'un mélange complexe. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC).

### II.1.3.1. Les couplages CPG-SM, CPG-SM(ICP) et CPG-SM(ICN)

D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG/SM en mode impact électronique (IE), dit CPG/SM(IE), est la technique utilisée en routine pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (Masada, 1976 ; Jennings et Shibamoto, 1980 ; Sandra et Bicchi, 1987 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Joulain et König, 1998 ; Adams, 1989 et 2001).

En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (Bilia *et al.*, 2002 ; Lianga *et al.*, 2004 ; Maia *et al.*, 2004 ; Chericoni *et al.*, 2004 ; Senatore *et al.*, 2004; Adio *et al.*, 2004). Ainsi, Vernin *et al.* en 1988 d'une part, Cavaleiro en 2001 d'autre part ont développé un logiciel leur permettant de combiner les résultats de la spectrométrie de masse avec les valeurs des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire.

Dans le cas des huiles essentielles riches en sesquiterpènes et en diterpènes, des problèmes d'identification peuvent subsister même si on utilise la SM-IE associée aux indices de rétention mesurés sur deux colonnes de polarité différente. Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) (Lange et Schultze, 1988 ; Schultze *et al.*, 1992). L'ICP et ICN produisent des ions quasi moléculaires correspondant à des ions qui ne sont pas visibles en mode impact électronique. Ainsi, la SM-ICP a permis de différencier les quatre stéréoisomères de l'isopulégol grâce à leur spectre de masse obtenu en utilisant l'isobutane comme gaz réactif (Lange et Schultze, 1988). La SM(IC) permet également de différencier les alcools et leurs esters par l'observation de leurs pics moléculaires.

L'observation de ces pics permet d'obtenir la masse molaire de ces composés et donc de savoir s'il s'agit d'un alcool ou d'un ester. C'est le cas par exemple, du (*E*)-nérolidol et de l'acétate de nérolidyle lorsque l'ammoniac est utilisé comme gaz réactif (Schultze *et al.*, 1992).

Toutefois, cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules ayant des structures voisines. Ainsi, le géraniol et le nérol qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une des doubles liaisons, possèdent des spectres de masse ICN identiques (Bruins, 1979). De plus, la difficulté d'obtenir des spectres en SM(ICN) ou la SM(ICP), reproductibles d'un laboratoire à l'autre ont fait que cette technique doit surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles (Zupanc *et al.*, 1992).

### II.1.3.2. Les couplages CPG-IRTF et CPG-IRTF-SM

La spectroscopie infrarouge renseigne en général sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères, par l'examen de la partie du spectre dite « des empreintes digitales » ou « fingerprint ». L'avènement de la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) autorisant une grande vitesse d'acquisition a permis de réaliser le couplage CPG-IRTF. Les limites de détection de l'IRTF ont considérablement été améliorées grâce au développement d'interfaces performantes (Sasaki et Wilkins, 1999). Le spectre obtenu peut être comparé à ceux contenus dans une bibliothèque informatisée de spectres Infrarouge. Le couplage CPG-IRTF peut s'appliquer à l'analyse de diverses familles de composés : les produits pétroliers et leurs additifs, les arômes, les essences naturelles, les produits de synthèse (Iob *et al.*, 1998 ; Thomaidis et Georgiou, 1999). Son efficacité a été démontrée notamment pour l'étude de molécules présentant des spectres de masse superposables tels que les stéréoisomères du farnésol et du menthol (Coleman et Gordon, 1989). Par ailleurs, Joulain et Laurent (1989) ont pu différencier, sur la base de leurs spectres IR et leurs indices de rétention sur colonne polaire et apolaire, l'endo-bourbonanol et le 1,6-germacradièn-5-ol, deux alcools sesquiterpéniques qui présentent des spectres de masse identiques. L'appareil de chromatographie peut être couplé en parallèle à la fois au détecteur Ir et au spectromètre de masse (Hedges et Wilkins, 1991). Ainsi la CPG permet dans la grande majorité des cas une individualisation des constituants nécessaire pour une bonne identification.

Cependant de nombreux métabolites secondaires trop lourds pour être volatilisés nécessitent l'utilisation d'une technique chromatographique en phase liquide.

### II.1.3.3. Le couplage CLHP-SM et CLHP-SM-SM

La Chromatographie Liquide Haute Performance s'adresse à des substances peu ou pas volatiles et parfois thermolabiles ou polaires. La mise en œuvre du couplage de la Chromatographie Liquide Haute Performance avec la Spectrométrie de Masse (CLHP-SM) nécessite de contourner

certains problèmes dus aux conditions opératoires des deux techniques comme la haute pression, la température ambiante et la phase liquide pour la CLHP et le vide poussé, la haute température et la phase gazeuse pour la SM. A titre d'exemple, le couplage CLHP-SM a permis l'identification d'esters sesquiterpéniques, d'alcaloïdes, xanthones, des séco-iridoïdes, dans des extraits méthanoliques mais aussi des psoralènes et des flavones à partir d'huiles essentielles (Cremin et *al.*, 1995 ; Dugo et *al.*, 2000 ; Mroczek et *al.*, 2004).

D'autres travaux ont mis en œuvre ce couplage pour l'analyse des terpènes (diterpènes acides ou glycosylés, triterpènes) dans des extraits au dichlorométhane de plusieurs espèces de *Potamogeton* (Waridel et *al.*, 2004), ou bien encore de composés phénoliques dans des vins rouges de Sardaigne (La Torre et *al.*, 2006).

La Spectrométrie de Masse (SM-SM) couplée avec la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP-SM-SM) a été utilisée, en particulier, pour la détermination des traces de pesticides dans la nourriture des nourrissons (Leandro et *al.*, 2006) ou encore pour la détermination de la streptomycine (antibiotique, antibactérien cytostatique et cytotoxique) et ses dérivés dans le lait et le miel (Van Bruijnsvoort et *al.*, 2004).

#### II.1.3.4. Le couplage CLHP-CPG-SM

De manière simplifiée, on peut considérer que le couplage CLHP-CPG-SM permet une séparation préalable des constituants du mélange en fonction de la famille à laquelle ils appartiennent (CLHP), puis l'individualisation des constituants d'une même famille (CPG), et l'identification étant réalisée par SM. Ce dispositif a permis l'identification de constituants présents à l'état de traces dans les huiles essentielles d'agrumes avec une grande fiabilité (Munari et *al.*, 1990 ; Mondello et *al.*, 1995)

#### II.1.3.5. Le couplage CLHP-RMN <sup>1</sup>H

La RMN du <sup>1</sup>H apporte des informations extrêmement précieuses sur la structure des molécules, mais présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que les techniques spectroscopiques décrites précédemment (IR et surtout SM). Néanmoins, la mise en œuvre de couplage CLHP-RMN <sup>1</sup>H a été rendu possible grâce au développement d'aimants supraconducteurs de plus en plus puissants (jusqu'à 23,5 Tesla), permettant ainsi d'abaisser le seuil de détection pour les composés à des valeurs de l'ordre du nanogramme. Ce couplage a aussi été rendu possible grâce au développement de colonnes capillaires dont la faible consommation en éluant permet d'employer des solvants deutérés, évitant ainsi d'avoir recours à des techniques d'irradiations sélectives (Wolfender et *al.*, 1998 ; Albert et *al.*, 1999 ; Victoria et Elipe, 2003).

L'utilisation de la CLHP couplée à la RMN s'est révélée efficace pour l'identification de molécules thermosensibles responsables de l'amertume de la bière (Pusecker et *al.*, 1999) et de flavonoïdes dans un extrait méthanolique de feuille de *Sorocea bomplandii* du Brésil (Andrade et *al.*, 2002). Plus récemment, la CLHP-RMN  $^1\text{H}$  a permis l'identification des produits de dégradation issus de l'acide 5-aminosalicylique dans un médicament générique (Novak et *al.*, 2006).

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que le couplage en ligne d'une technique chromatographique (permettant leur identification) se révèle performant dans divers types d'analyses. Toutes ces méthodes présentent certaines limites, notamment l'utilisation abusive des banques informatisées (Joulain, 1994). Devant la complexité de certains mélanges, il a été nécessaire d'utiliser une méthode d'analyse, en deux étapes, basée sur la purification des constituants de mélanges particulièrement complexe avant leur identification. Elle est illustrée par la voie B.

## II.2. Identification des constituants après purification : Voie B

La séquence opérationnelle développée ici s'apparente à ce qui est fait lors de l'isolement et la caractérisation spectroscopique d'une nouvelle molécule. Le mélange est d'abord fractionné par différentes techniques chromatographiques, telles la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM), la CLHP ou la chromatographie en phase gazeuse préparative (CPGP) précédées ou non d'une distillation fractionnée ou d'une cristallisation.

Les différents constituants isolés ou présents dans des fractions enrichies sont ensuite identifiés par comparaison de leurs données spectrales avec celles de composés de références : spectre de masse, spectre IR, spectres de RMN du  $^1\text{H}$  ou du  $^{13}\text{C}$  (lorsque la quantité de produit isolée est suffisante), éventuellement RMN bidimensionnelle. Cette voie est extrêmement fiable et permet d'identifier les composés présents dans les mélanges naturels et décrits dans la littérature.

Cette séquence en deux étapes « purification-identification » est la première qui a été utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Par la suite, elle a été supplantée par la voie A, plus rapide. Mais elle est toujours utilisée dans le cas des huiles essentielles complexes car sa grande fiabilité compense l'investissement en temps qu'elle requiert. Pour illustrer l'intérêt de cette méthode de travail, nous pouvons citer à titre d'exemple, les travaux de Weyerstahl et *al.*, qui ont décrit la composition chimique de diverses huiles extrêmement complexes (Weyerstahl et Schlicht, 1997 ; Weyerstahl et *al.*, 1996/1997/2000a/2000b/2000c). Ainsi, l'huile essentielle de vétiver d'Haïti est réputée pour être l'une des plus complexes du monde car elle est composée de très nombreux composés minoritaires sesquiterpéniques aux propriétés physico-chimiques et aux données spectroscopiques voisines. Il est par conséquent très difficile d'isoler ces composés et de les

identifier. L'huile essentielle a été fractionnée suivant une partition acido-basique. La partie neutre a été soumise à une distillation fractionnée qui a permis de séparer les produits lourds des produits légers, puis les différents constituants ont été séparés par CC répétitives puis éventuellement par CCM. Ces constituants ont ensuite été analysés par CPG/SM, RMN du  $^1\text{H}$ , et parfois RMN du  $^{13}\text{C}$ . La partie acide a été soumise à une réaction d'estérification ou de réduction avant la séparation des constituants. Ainsi, près de 170 composés sesquiterpéniques mono- ou polyfonctionnalisés, ont été identifiés. Certains de ces composés possèdent des squelettes originaux et rares tels que prézizaane, zizaane, khusiane, cyclopacamphane, spirovétivane, épi-, seco- et nor- eudesmanes, oppositane...

Parmi les travaux récents, nous pouvons citer les travaux de Delort et Jaquier (2009) sur l'huile essentielle de fruits de *Citrus australasica*. L'analyse par CPG/SM et RMN du  $^{13}\text{C}$  de chaque fraction obtenue après séparation par chromatographies répétitives a permis l'identification de 195 composés dont 4 nouveaux esters menthaniques. Ici et dans de nombreux cas, l'individualisation des constituants n'est plus nécessaire. L'enrichissement, combiné à des techniques spectroscopiques telles la RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ , permet une identification des constituants.

Après ce bref tour d'horizon des principales méthodes d'analyses des mélanges complexes naturels, il nous est possible de formuler quelques observations. La voie A, s'illustre par sa rapidité, particulièrement bien adaptée aux analyses de routine et aux composés volatils, notamment dans le domaine des huiles essentielles. La voie B, plus longue, s'adresse à un plus grand nombre de familles chimiques et présente des applications allant des mélanges non volatils (huiles essentielles complexes) jusqu'aux extraits (coumarines, flavonoïdes,...). Elle permet d'utiliser, en tant que de besoin, les données de la RMN pour l'identification des constituants d'un mélange naturel. Une troisième voie, la Voie C, intermédiaire par rapport aux précédentes, fonde l'identification et si besoin la quantification des principaux constituants des mélanges naturels (huiles essentielles, huiles végétales, résines, extraits, ...) sur l'étude du spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du mélange, sans séparation préalable.

### II.3. Analyse par RMN du $^{13}\text{C}$ sans séparation préalable : Voie C

La RMN du  $^{13}\text{C}$  a été utilisée depuis le début des années quatre vingt pour confirmer la présence d'un constituant dans un mélange complexe naturel, préalablement identifié par une autre technique, la SM par exemple. Le principe de cette méthode est simple : il s'agit d'observer dans le spectre du mélange, les raies de résonance appartenant à un composé donné et ce faisant identifier ce composé. Comme nous l'avons mentionné, l'objectif de cette méthode est donc d'éviter, ou tout au moins de réduire, les étapes fastidieuses de purification des constituants.

La RMN du  $^{13}\text{C}$ , en tant qu'outil d'analyse des mélanges, a fait l'objet de travaux dans différents domaines d'investigation : coupes pétrolières, produits agroalimentaires, huiles essentielles. Dans le droit fil des travaux précurseurs de Formàcek et Kubeczka (1982a ; 1982b) dans le domaine des huiles essentielles, la plupart des études continuent à utiliser la RMN comme méthode de confirmation plutôt que méthode d'identification. Depuis le début des années 1990, les travaux menés par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse, ont fait de la RMN du  $^{13}\text{C}$ , un véritable outil d'analyse des mélanges complexes naturels (Corticchiato et Casanova, 1992 ; Tomi et *al.*, 1995) complémentaire des techniques conventionnelles développées. Nous allons développer dans les paragraphes suivants l'intérêt ainsi que les différents paramètres permettant par cette méthode une identification optimale.

### II.3.1. Intérêt de la RMN du $^{13}\text{C}$ pour l'analyse des mélanges complexes

Malgré sa faible abondance isotopique naturelle (1,1%) et son moment gyromagnétique qui le rendent environ 5 700 fois moins sensible que le proton (Günther, 1994), le  $^{13}\text{C}$  est malgré tout préféré aux autres noyaux dans le domaine de l'analyse des mélanges complexes car il présente les avantages suivants :

- Le carbone constitue le squelette de toutes les molécules organiques et les différents atomes présents sont, à quelques exceptions près, magnétiquement non équivalents. Donc, on observe en général dans un spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  autant de raies de résonance qu'il y a de carbones dans la molécule ;

- Les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  peuvent être simplifiés par irradiation par découplage total des noyaux d'hydrogène, ce qui permet de n'observer dans le spectre qu'une seule raie de résonance par carbone. En plus l'effet NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) résultant de ce découplage des protons produit une augmentation d'intensité du signal (Williamson et Neuhaus, 1989) ;

- Le temps de relaxation transversal T2 (temps de relaxation spin-spin) est plus important pour le carbone que pour le proton. La largeur à mi-hauteur du signal de résonance étant inversement proportionnelle à T2, il en résulte un gain dans la finesse des pics et donc en résolution ;

- Le domaine de résonance du carbone s'étend sur une plage beaucoup plus vaste que celle du proton (schématiquement, 240 ppm par rapport à 12 ppm), ce qui améliore notablement la résolution effective, c'est-à-dire la dispersion spectrale (Tomi et *al.*, 1995) ;

- L'enregistrement des spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  est réalisé à température ambiante. Cela évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles ;

- La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré et soumis à d'autres analyses.

### II.3.2. Identification des constituants en mélange par RMN du $^{13}\text{C}$

L'identification des constituants d'un mélange par RMN du  $^{13}\text{C}$  est réalisée par comparaison des déplacements chimiques du mélange avec ceux des composés de référence contenus dans une ou plusieurs bibliothèques de spectres. Par rapport aux précédentes techniques de couplage entre un chromatographe et un spectromètre, dans le cas de la RMN, chaque composé ne fait pas l'objet d'une individualisation. Pour identifier un composé au sein d'un mélange, il faut être à même de pouvoir observer les signaux qui lui appartiennent et de les individualiser, puis d'attribuer les déplacements chimiques à une molécule donnée. Pour cela, les conditions expérimentales d'enregistrement des spectres doivent être optimisées et standardisées de façon à permettre une bonne reproductibilité des résultats obtenus. Il est également important de savoir apprécier la concentration minimale d'un produit minoritaire dans le mélange, permettant l'observation de ses signaux dans le spectre.

#### II.3.2.1. Observation et individualisation des signaux

L'observation des raies de résonance des carbones d'une molécule dans le spectre d'un mélange dépend de divers paramètres :

- la sensibilité de l'appareil qui s'exprime par le rapport signal sur bruit (S/B) ;
- la masse de produit disponible ;
- la solubilité du produit dans le solvant choisi ainsi que de sa viscosité ;
- le nombre d'acquisitions.

Grâce au développement des aimants supraconducteurs, la RMN voit sa sensibilité augmenter avec l'intensité du champ magnétique des aimants (23,5 Tesla pour le plus performant). Il est donc possible d'utiliser des quantités de plus en plus faibles de produit, ce qui peut être utile dans des cas particuliers, mais qui ne constitue pas, d'une manière générale, un handicap majeur, car les produits naturels sont en général disponibles en quantités appréciables. C'est pourquoi, il est possible de réaliser des spectres de RMN de mélanges naturels avec des appareils de routine, 1,9 Tesla lors des premières expériences, 4,7 Tesla pendant longtemps et 9,4 Tesla de nos jours.

Par ailleurs, certaines séquences impulsionsnelles permettent d'augmenter la sensibilité. Ainsi, l'irradiation des protons liés aux noyaux de carbone, produit par l'intermédiaire de l'effet Overhauser Nucléaire (NOE), une augmentation d'intensité pouvant s'élever à 200% (Günther,

1994 ; Hesse et *al.*, 1997). Cette technique est couramment utilisée lors de l'enregistrement des spectres de mélanges, ne serait ce que pour simplifier les spectres.

L'amélioration du rapport S/B et l'observation du maximum de signaux dans le spectre, nécessitent d'augmenter le nombre d'acquisitions. Néanmoins, le rapport S/B étant proportionnel à la racine carrée du nombre d'acquisitions, au-delà d'un certain seuil, le temps d'analyse et donc le temps d'occupation de l'appareil devient prohibitif par rapport au gain. Si les composés sont en trop faible quantité (teneur trop faible dans le mélange), il est difficile d'obtenir un rapport S/B correct, même en augmentant considérablement le nombre d'acquisitions.

Afin de réduire le temps d'utilisation de l'appareil, il est parfois possible de disposer de sondes de 10 mm (au lieu des sondes habituelles de 5 mm) ce qui permet quasiment de tripler la quantité de substance disponible pour l'enregistrement du spectre.

Le choix du solvant est également important, surtout quand certains constituants du mélange ont une masse molaire élevée et/ou sont polyfonctionnalisés. Cependant une large gamme de solvants deutérés est actuellement disponible.

Parallèlement à la sensibilité, il faut tenir compte de la résolution de l'appareil qui permet d'individualiser les signaux dans le spectre du mélange. On peut définir la limite de résolution comme la plus petite différence de fréquence entre deux signaux de résonance pouvant encore être enregistrés séparément (Williamson et Neuhaus, 1989). L'individualisation des signaux d'un composé pur pose rarement des problèmes, les superpositions fortuites des signaux de deux carbones étant assez exceptionnelles. En revanche, dans le cas du spectre d'un mélange complexe, le nombre de constituants et le nombre de carbones qui composent chaque molécule, sont autant de facteurs qui augmentent la probabilité de superposition de raies de résonance. La résolution est donc un facteur essentiel pour l'identification des constituants d'un mélange complexe.

Divers paramètres influent sur la résolution :

- Plus le champ magnétique est élevé, meilleure est la résolution. Cette meilleure séparation des signaux de résonance des différents noyaux permet de limiter le nombre de superpositions se produisant fortuitement et donc de faciliter l'identification. Il en résulte une interprétation plus facile des spectres, ce qui est primordial dans le cas des études réalisées sur les composés ayant une masse moléculaire élevée (oligomères et protéines par exemple) dont les spectres sont extrêmement complexes ;

- D'un point de vue informatique, diverses techniques d'acquisition des données et/ou de traitement du signal permettant d'améliorer la résolution sont disponibles. L'utilisation de convertisseurs numériques performants améliore le traitement des données tout comme l'utilisation

de multiplications exponentielles effectuées directement sur le signal de la FID (décroissance libre d'induction) avant la transformée de Fourier (Günther, 1994 ; Claridge, 1999) ;

- Enfin, l'utilisation d'une largeur spectrale réduite, permettant d'enregistrer le spectre sur une zone d'intérêt, ou en plusieurs portions, permet une amélioration de la résolution. A titre d'exemple, en utilisant cette technique pour enregistrer le spectre d'un mélange des deux diastéréoisomères du farnésane (2,6,10-triméthylododécane) avec un appareil opérant à 5,8 T. Alemany (1989) a pu observer 29 signaux sur les 30 attendus, certains d'entre eux n'étant séparés que de 0,003 ppm.

### II.3.2.2. Attribution des signaux dans le spectre d'un mélange complexe

La RMN procure trois types de données spectrales qui sont : le déplacement chimique ( $\delta$ ), la multiplicité et l'intensité des signaux. Son intérêt réside dans sa faculté à reconnaître un noyau par rapport à son environnement dans la molécule. La fréquence de résonance des carbones et donc le déplacement chimique est très sensible à l'environnement stérique et électronique. La moindre modification structurale se traduit par des variations plus au moins importantes, mais mesurables, des déplacements chimiques de pratiquement tous les carbones de la molécule. Contrairement à la majorité des autres techniques, il est très peu probable que deux composés même s'ils possèdent des structures identiques ou très proches présentent des spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  superposables ou insuffisamment différenciés. Il en résulte que le déplacement chimique est la donnée spectroscopique la plus utilisée pour identifier un composé connu dans un mélange.

Ainsi, chaque molécule sera définie par une série de déplacements chimiques qui constituera son spectre, et en quelque sorte son empreinte digitale, à partir duquel elle pourra être identifiée. La valeur d'un déplacement chimique peut varier de manière plus au moins importante en fonction du type de solvant, de la concentration des composés et de la température. L'utilisation des spectres décrits dans la littérature récente comme données de référence pour l'identification des composés en mélange est possible. Néanmoins, afin d'obtenir une meilleure reproductibilité des déplacements chimiques, il faudrait que les conditions d'analyse des spectres des mélanges soient identiques à celle des composés de références.

Nous détaillerons ci-dessous, quelques exemples d'utilisation de la RMN du  $^{13}\text{C}$  pour l'identification des constituants de mélanges complexes, dans les domaines des huiles essentielles.

Ainsi, la RMN du  $^{13}\text{C}$  a permis l'identification des principaux composés de l'huile essentielle de *Echinophora sibthorpiana* (Ahmad et Jassbi, 1999) et de 12 sesquiterpènes présents dans une fraction chromatographique de l'huile essentielle de bois de *Guarea guidonia* (Núñez et Roque, 1999). Plus récemment, une méthode d'identification des constituants d'un mélange complexe par

RMN du  $^{13}\text{C}$  a été développée par Ferreira et *al.* en 2001. Elle est basée sur la comparaison du spectre du mélange avec des mono- et des sesquiterpènes décrits dans la littérature.

### II.3.3. Méthode d'analyse développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse

Depuis 1989, l'équipe « Chimie et Biomasse » utilise la RMN du  $^{13}\text{C}$  comme outil d'analyse des mélanges naturels. L'objectif à atteindre a pour but l'identification, et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans étape préalable de purification ou avec un fractionnement réduit autant que possible (Corticchiato et Casanova, 1992 ; Tomi et *al.*, 1995).

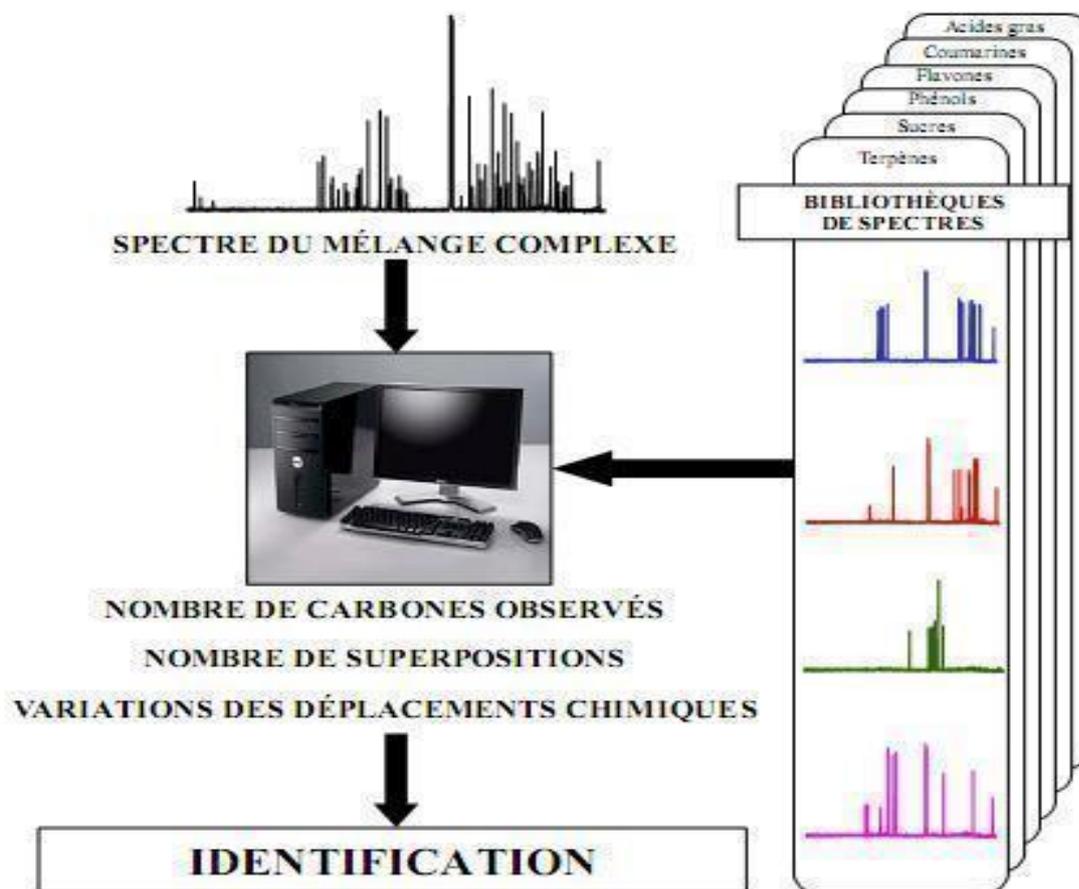
Selon la méthode mise au point et développée au laboratoire, l'identification des composés dans le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  du mélange, est réalisée par comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux de produits de référence contenus dans des banques de données spectrales conçues à cet effet. L'enregistrement des spectres de référence et des mélanges sont réalisés dans les mêmes conditions expérimentales (nature du solvant, concentration, paramètres d'enregistrement des spectres). Cette méthode de la même manière que celle initiée par Formáček et Kubeczka en 1982 ne nécessite aucune individualisation préalable des constituants, il s'agit d'une véritable méthode analytique d'identification et non de confirmation des constituants d'un mélange. De plus, son originalité réside dans l'informatisation du traitement des données spectroscopiques grâce à un logiciel d'aide à l'identification spécialement élaboré au laboratoire (Figure 3). Ce logiciel permet en plus, l'édition de toutes les informations nécessaires à la caractérisation des constituants d'un mélange, à savoir l'attribution des pics, les variations des déplacements chimiques et les superpositions.

Ainsi, l'identification des composés présents dans un mélange est réalisée par la prise en compte de trois paramètres directement accessibles par le logiciel :

- Le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule ;
- Le nombre de superpositions de pics qui peuvent se produire quand deux carbones appartenant à des molécules différentes présentent fortuitement le même déplacement chimique;
- Les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de références ;
- De plus, l'intensité des pics permet éventuellement de contrôler l'appartenance du signal d'un carbone à tel ou tel composé.

Cette méthode a été appliquée à différentes familles de molécules (terpènes, lipides, sucres, phénols) selon un protocole expérimental spécifiquement adapté à chaque famille (nature du solvant, dilution, paramètres d'enregistrement des spectres). Ainsi, différentes bibliothèques de spectres ont été créées à partir de produits commerciaux et sont continuellement enrichies avec les

spectres des produits isolés à partir de mélanges naturels ou bien encore préparés par hémisynthèse.



**Figure (3) : Identification des constituants d'un mélange complexe par RMN du  $^{13}\text{C}$**

L'utilisation de la RMN du  $^{13}\text{C}$ , devient particulièrement intéressante lorsqu'elle permet d'identifier rapidement et sans ambiguïté, des composés délicats à analyser par les techniques conventionnelles. Dans le domaine des huiles essentielles, des résultats très intéressants ont été obtenus dans le laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse.

- Dans un même mélange, deux douzaines de composés avaient été identifiés dans une huile essentielle avec un spectromètre pourvu d'un aimant de puissance 4,7 Tesla. L'utilisation d'un appareil fonctionnant avec un aimant de 9,4 Tesla a permis un gain pouvant atteindre 50%. Ainsi, dans le meilleur des cas une huile essentielle de *Piper bavinum* du Viêt-Nam, 38 constituants, présents avec des teneurs comprises entre 0,4 et 10% ont pu être identifiés sans aucune séparation préalable (Lesueur et *al.*, 2009) ;

- La teneur minimale des composés identifiables avec le spectromètre (9,4 T) est de l'ordre de 0,5%. Parfois, des composés présents à des teneurs inférieures peuvent être identifiés (0,4% et même 0,3%) ;

- En général, tous les carbones des molécules identifiées sont observés, à l'exception de certains carbones quaternaires (qui relaxent moins bien que les carbones liés à des protons et donnent donc un signal moins intense dans les conditions de l'expérience) appartenant aux composés minoritaires ;

- Le nombre de superpositions est limité et ne constitue pas, dans la grande majorité des cas, un facteur limitant ;

- Les variations des déplacements chimiques ( $\Delta\delta$ ) sont généralement inférieures à 0,05 ppm pour la très grande majorité des cas. Il y a quelques exceptions, en particulier avec les composés phénoliques (thymol, carvacrol...) dont certains carbones présentent de plus importantes variations des déplacements chimiques selon la polarité et la fonctionnalisation des autres constituants du mélange. Dans ce cas précis une dilution permet de diminuer ces variations importantes des déplacements chimiques.

### **II.3.3.1. Application à l'analyse d'huiles essentielles ainsi qu'à d'autres mélanges naturels**

L'analyse par RMN du  $^{13}\text{C}$  est complémentaire des techniques conventionnelles exposées précédemment dans les voies A et B. Nous rappelons ici quelques études réalisées au sein du laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse.

### **II.3.3.2. Caractérisation des huiles essentielles**

La caractérisation des huiles essentielles peut prendre plusieurs aspects en fonction du besoin et de l'objectif assigné. Ainsi, dans la très grande majorité des huiles essentielles, les 15-25 composés majoritaires représentent 80-95% de la composition globale et sont donc suffisants pour caractériser cette huile essentielle. Il faut toutefois signaler que la connaissance des composés minoritaires est parfois un paramètre important de la qualité biologique ou organoleptique du produit et qu'en conséquence une analyse fine est nécessaire. Il faut également signaler qu'une analyse peut être totalement faussée par la mauvaise identification d'un seul constituant.

Au laboratoire, la méthode d'analyse basée sur la RMN du  $^{13}\text{C}$ , utilisée en complément de la CPG(Ir) ou en combinaison avec la CPG(Ir) et CPG/SM, a permis de caractériser un grand nombre d'huiles essentielles obtenues à partir de plantes de Corse, de Sardaigne et du pourtour méditerranéen, d'Afrique, d'Asie, d'Amérique centrale et du sud.

- L'analyse du spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  de l'huile essentielle de feuilles d'*Eupatorium coelestinum* du Viêt-Nam, a clairement montré la présence, parmi les composés majoritaires, du cis-cadin-4-èn-7-ol, dont les indices de rétention et le spectre de masse n'étaient pas présents dans les bibliothèques commerciales (Dung et al., 1998) ;

- Un sesquiterpène inhabituel, le 1,5-epoxysalvial-4(14)-ène, qui n'avait jamais été décrit dans les huiles essentielles d'aucune espèce de Piper, a été identifié dans l'huile essentielle de *Piper obliquum* de Panama (Mundina et al., 1998) ;

- La 5-[(E)-hexylidène]-5H-furan-2-one et son isomère Z ont été identifiées dans l'huile essentielle de feuilles d'*Isolona cooperi* de Côte d'Ivoire alors que ces molécules n'étaient présentes dans aucune des bibliothèques informatisées dont nous pouvons disposer (Boti et al., 2005).

### II.3.3.3. Identification des stéréoisomères

La RMN du  $^{13}\text{C}$  est un bon moyen d'identifier certains stéréoisomères dont l'analyse par les techniques conventionnelles est délicate. A titre d'exemple, nous pouvons citer l'identification des stéréoisomères du dihydrocarvéol réalisée au laboratoire (Bradesi et al., 1994), dont nous avons vu, dans un paragraphe précédent que l'identification avait nécessité l'utilisation de la SM-SM(ICN) (Decouzon et al., 1990). De même, les isomères géométriques des sesquiterpènes linéaires farnésol, acétate de farnésyle et farnésal ont pu être différenciés malgré la similitude des structures (Bradesi et al., 1995).

### II.3.3.4. Identification des molécules thermosensibles

La RMN du  $^{13}\text{C}$  a également pu être utilisée pour analyser des molécules thermosensibles dans des huiles essentielles. Ainsi l'identification et la quantification du furanodiène et du furanoélémente ont été rendues possibles dans l'huile essentielle des rhizomes et des fleurs de *Smyrniium olustrum* de Corse (Baldovini et al., 2001).

De même, cette technique analytique a également permis d'identifier et de quantifier l'ascaridole et son isomère (isoascaridole) dans l'huile essentielle de *Chenopodium ambrosioides* de Madagascar (Cavalli et al., 2004).

### II.3.3.5. Étude de la variabilité chimique

En permettant l'identification, des composés jusqu'à une teneur de 0,3-0,5%, la RMN du  $^{13}\text{C}$  combinée à une quantification par CPG (indices de rétention), est bien adaptée à l'étude de la variabilité chimique puisqu'elle permet d'identifier, à partir d'un spectre unique, les composés

majoritaires d'une huile essentielle ou d'une résine. Elle a été appliquée avec succès à de nombreuses huiles essentielles dont *Thymus herba barona* de Corse (Corticchiato et al., 1998), *Thymus carnosus*, *T. caespititius*, *T. camphoratus* du Portugal (Salgueiro et al., 1995/1997a/1997b), et *Baekkea frutescens* du Viêt-Nam (Thi Tam et al., 2004), *Pistacia lentiscus* d'Algérie (Mecherara-Idjeri et al., 2008a/2008b) et *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* d'Algérie (Bekhechi et al., 2012).

### II.3.3.6. Analyse structurale de nouvelles molécules

A *contrario* de ce qui a été exposé jusqu'à présent, l'analyse structurale d'un composé inconnu, c'est-à-dire non décrit dans la littérature, ne peut être réalisée qu'à partir d'un produit purifié par différentes techniques, généralement chromatographiques (CC, CCM, CLHP ou CPG). Elle requiert donc une quantité suffisante de produit pur (quelques milligrammes) afin de réaliser une étude complète par toutes les méthodes spectroscopiques habituelles (SM, IRTF, UV, RMN du  $^1\text{H}$ , RMN du  $^{13}\text{C}$  et RMN 2D). A partir de la combinaison de toutes ces techniques complémentaires, il est possible d'établir la structure chimique de la molécule inconnue.

De nos jours, la RMN (1D et 2D) constitue manifestement la technique analytique la plus performante et la plus utilisée pour l'élucidation structurale des molécules. La RMN 2D, en particulier, permet la mise en évidence des interactions homo- et hétéronucléaires entre les différents noyaux (Claridge, 1999). Parmi les diverses séquences, les expériences de corrélation entre les différents protons d'une molécule, voisins (COSY) et à longue distance (COSY Long Range, NOESY), ou entre protons et carbones (HSQC, HMBC), fournissent des renseignements précieux sur la structure moléculaire et facilitent considérablement l'analyse structurale. La séquence de corrélation homonucléaire carbone-carbone (INADEQUATE) conduit à la structure sans ambiguïté mais nécessite une quantité de produit plus importante que pour la mise en œuvre des autres séquences (Derome, 1987).

Au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse, de nouvelles molécules ont été isolées et caractérisées lors de l'analyse de certaines huiles essentielles. Après séparation et purification par chromatographies successives (colonnes de silice, Sephadex), ces molécules ont été caractérisées par les techniques spectroscopiques conventionnelles incluant la RMN du  $^1\text{H}$ , la RMN du  $^{13}\text{C}$  et la RMN 2D.

Ainsi, le *trans*-dauc-8-èn-4β-ol a été identifié dans l'huile essentielle de *Daucus carota* (Mazzoni et al., 2003), le 4-épi-*cis*-dihydroagarofurane dans l'huile essentielle de *Cedrelopsis grevei* de Madagascar (Cavalli et al., 2004), l'eudesm-5-èn-11-ol dans l'huile essentielle d'*Helichrysum italicum* de Corse (Bianchini et al., 2004).

En conclusion, il ressort de cette synthèse bibliographique, que la méthode mise au point et développée au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de Corse., d'identification (et éventuellement de quantification) des constituants des mélanges naturels, basée sur l'analyse informatisée du spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du mélange, sans séparation préalable, est efficace et complémentaire des techniques conventionnelles. Elle peut être appliquée à toute sorte de mélanges naturels, contenant des composés volatils ou non volatils, huiles essentielles, résines, extraits aux solvants, biocombustibles, biocarburants, huiles végétales, miels, etc. Elle permet d'identifier et de quantifier des composés volatils ou non, des stéréoisomères, des molécules thermolabiles, sans séparation ni dérivatisation préalable, après optimisation et validation des conditions expérimentales à chaque famille de composés.

## Chapitre III : POUVOIR ANTIMICROBIEN DES HUILES ESSENTIELLES

### I. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont, par définition, « des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (Prescott et *al.*, 1995). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

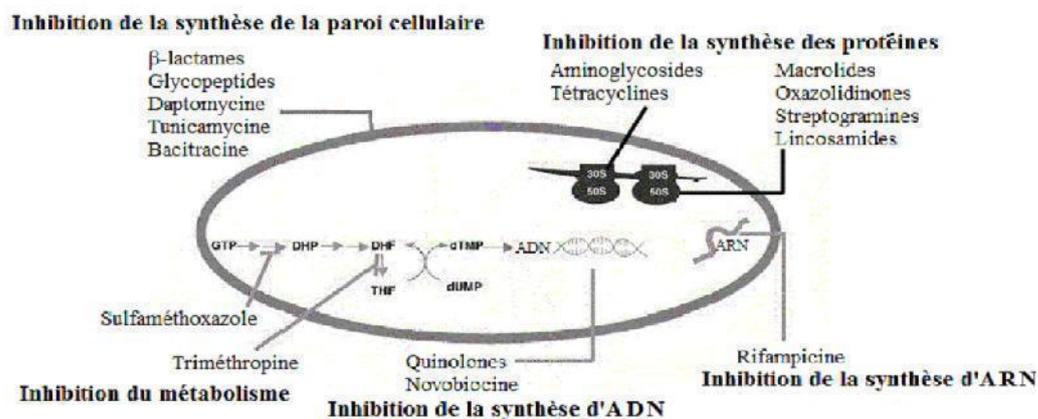
L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de « bactériostatiques » alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits « bactéricides ».

#### I.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman et *al.*, 2003 ; Singh et Barrett, 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de micro-organismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes.

#### I.2. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie (Figure 4).



DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF ; tétrahydrofolate

Figure (4) : Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006)

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens.

## **II. La résistance aux antibiotiques**

### **II.1. La résistance naturelle**

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle.

### **II.2. La résistance acquise**

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens et *al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (Yagupsky, 2006).

L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (Yagupsky, 2006).

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (Alekshun et Levy, 2007).

### **II.3. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques**

Les résistances s'étendent quantitativement mais aussi qualitativement. Depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes (Alekshun et Levy, 2007). L'impact de cette multi-résistance aux antibiotiques est important au niveau clinique, en termes de morbidité et de mortalité, mais aussi sur le plan

économique car les infections liées aux bactéries multi-résistantes engendrent des coûts d'hospitalisation élevés (Cosgrove *et al.*, 2005 ; Maragakis *et al.*, 2008).

Les infections causées par les bactéries résistantes et multi-résistantes, autrefois cantonnées au milieu hospitalier, deviennent communautaires (extra-hospitalières) (Crum, 2005). Ainsi, le nombre de personnes, susceptibles d'être exposées aux bactéries résistantes et multi-résistantes, est continuellement démultiplié (Maltezou et Giamarellou, 2006).

#### **II.4. Les mécanismes de résistance**

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances. Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante de trois phénomènes : la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien, l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique et l'altération de leurs cibles cellulaires (Levy et Marshall, 2004).

#### **III. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne**

La montée des résistances contre les principales classes d'antibiotiques, combinée au nombre limité d'agents en cours de développement, a conduit à l'avènement de l'ère post-antibiotique. Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les champs d'investigation sont vastes. Toutefois, deux grandes stratégies, recourant aux progrès récents de la modélisation moléculaire, de la biologie moléculaire, de la génomique et de la protéomique, se dessinent dans le domaine de la recherche. La plus originale se base sur l'identification de nouvelles cibles bactériennes, en vue de développer des agents susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance ou d'interférer avec la virulence bactérienne (Tan et Darren, 2000 ; Schmidt, 2004 ; Falconner et Brown, 2009).

Au lieu de tuer les bactéries, ces nouvelles molécules atténueraient leur pouvoir pathogène en ciblant leurs gènes de résistance, leurs facteurs de virulence ou en entravant la communication intercellulaire. L'idée sous-jacente est d'empêcher les bactéries de s'adapter à leur environnement sans porter atteinte à leur survie, ce qui devrait ainsi limiter l'apparition des résistances.

En réduisant la pathogénicité et la résistance bactérienne, ces molécules devraient permettre de restaurer l'activité des antibiotiques conventionnels devenus aujourd'hui inefficaces.

Les efforts se concentrent également sur la recherche d'agents antibactériens, capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action (Tan et *al.*, 2000 ; Schmidt, 2004 ; Falconner et Brown, 2009). Ces molécules devraient être radicalement différentes des antibiotiques classiques, qui concentrent leurs effets sur une seule et même cible bactérienne.

Aussi, pour être innovants, les nouveaux antibactériens devraient pouvoir induire la mort cellulaire en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant des mécanismes d'action originaux. Depuis quelques années, les substances naturelles, qui avaient été délaissées au profit des molécules de synthèse, connaissent un regain d'intérêt. Les ressources naturelles sont donc à nouveau exploitées pour mener à terme de telles recherches.

Actuellement, l'accent est mis sur l'exploration de nouveaux produits naturels, comme les peptides antimicrobiens (Brogden et *al.*, 2003 ; Ganz, 2003), qui montrent déjà des résultats prometteurs et les huiles essentielles (Marquier, 2002).

#### **IV. Les huiles essentielles**

##### **IV.1. Définition**

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal, elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (Padrini et Lucheroni, 1996).

##### **IV.2. Les activités biologiques des huiles essentielles**

Le rôle physiologique des huiles essentielles pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés. De nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir anti-oxydant (Mantle et *al.*, 1998 ; Karioti et *al.*, 2006).

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni* et *Protium grandifolium* (Siani et *al.*, 1999), ou plus récemment, pour l'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* (Dordevic et *al.*, 2007), qui est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat.

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé (Burt, 2004) ont été décrites. L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* (Barel et *al.*, 1991), *A. setacea*, *A. teretifolia* (Unlu

et *al.*, 2002) et *A. millefolium* (Candan et *al.*, 2003), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence.

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek et *al.*, 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa et *al.*, 2004).

D'autres applications médicales sont étudiées. Les travaux de Jafri et *al.* en 2001 ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de cardamome à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol. Il a également été démontré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'œstradiol (Monti et *al.*, 2002).

#### **IV.3. Les activités antibactériennes des huiles essentielles**

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif.

Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries à Gram négatif, telles que *Aeromonas hydrophila* (Wan et *al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn et *al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie à Gram négatif *P. aeruginosa* (Dorman et Deans, 2000). La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (May et *al.*, 2000 ; Tohidpour et *al.*, 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Fisher et Phillips, 2009). Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la

croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* et *Staphylococcus aureus* (Shin et Kim, 2005).

#### **IV.4. Les constituants des huiles essentielles**

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (Buchanan et *al.*, 2000).

La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural.

Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes.

Ainsi, les monoterpénoïdes (C10) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesquiterpénoïdes (C15) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono- et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles. Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle.

#### **IV.5. Mode d'action des huiles essentielles sur les microorganismes**

##### **IV.5.1. Mode d'action antibactérien**

Plusieurs travaux sont menés pour comprendre le mécanisme d'action des huiles essentielles (Chang et *al.*, 2001). Certains auteurs suggèrent que ces produits naturels pénètrent dans la cellule microbienne et sont susceptibles d'interférer avec son métabolisme cellulaire (Marino et *al.*, 2001). D'autres avancent que les huiles essentielles perturbent le bon fonctionnement de la membrane plasmique et réagissent avec les sites actifs des enzymes ou servent de transporteur de proton en réduisant la synthèse de l'ATP (Chang et *al.*, 2001 ; Ultee et *al.*, 2002). Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases (Burt, 2004 ; Oussalah et *al.*, 2007) :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- Destruction de matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

L'activité d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (Dorman et Deans, 2000 ; Ultee et *al.*, 2002).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (terpinène-4-ol et linalol), les aldéhydes et enfin, les cétones (Cosentino et Palma, 1999). Les alcools agissent généralement en dénaturant les protéines, comme solvant ou comme agents de déshydratation (Dorman, 2000).

La structure chimique des constituants des huiles essentielles influence directement leur activité. Ainsi, le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Une étude, menée par Ultee et *al.*, 2002, a ainsi mis en évidence l'importance du noyau benzénique, en démontrant le manque d'activité du menthol comparée à celle du carvacrol. Le rôle fondamental du groupement hydroxyle dans l'action des phénols a également été confirmé (Dorman et Deans, 2000 ; Ultee et *al.*, 2002) et sa position relative sur le noyau benzénique influence peu le degré d'activité. Ainsi, le thymol et le carvacrol, qui ne diffèrent que par la position ortho/méta du substituant hydroxyle, présentent une activité comparable sur des souches de *Bacillus cereus*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Lambert et *al.*, 2001 ; Ultee et *al.*, 2002). D'autres groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes. L'acétate de géranyle est plus actif que le géraniol contre un grand nombre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Dorman et Deans, 2000). La nature des groupements alkyles peut également influencer cette activité : les substituants alkényles sont plus actifs que les substituants alkyles. Ainsi, le limonène, qui est substitué par un groupement isopropylène en position 4, présente une plus haute activité que son homologue le *p*-cymène, substitué par un groupement isopropyle (Dorman et Deans, 2000).

Les aldéhydes peuvent induire des réactions de transferts d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (Dorman, 2000).

Les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane (Shunying, 2005).

Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert et *al.*, 2001). En détruisant la membrane externe des bactéries à Gram négatif, augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander et *al.*, 1994). Le mode d'action du carvacrol a été bien étudié sur *B. cereus*. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se positionne entre les chaînes d'acides gras. Cette déformation de la structure augmente la fluidité membranaire, aboutissant à une modification de la perméabilité

passive. Chez les bactéries exposées au carvacrol, on observe une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une diminution du potentiel membranaire.

Ainsi, le carvacrol, en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, n'entraîne pas une fuite d'ATP mais une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et, donc, de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. Le carvacrol formerait des canaux dans la membrane permettant la fuite des ions (Ultee et *al.*, 2002).

L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (Trombetta et *al.*, 2005). Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire.

Le cinnamaldéhyde est le principal constituant de l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum cassia*). Ce composé est très actif contre de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter sp.*). Il inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (Gill et Holley, 2004 et 2006).

L'eugénol est le principal composant de l'huile essentielle de clou de girofle. Comme le carvacrol, il provoquerait une dégradation de la paroi cellulaire entraînant une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires (Gill et Holley, 2006).

Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires. La résistance aux antibiotiques est un phénomène biologique que la médecine aura du mal à faire disparaître. L'évolution permettra toujours aux bactéries de s'adapter. Une meilleure utilisation des antibiotiques ne pourra que ralentir l'extension des résistances et la découverte de nouvelles molécules actives reste une nécessité. Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

#### **IV.5.2. Mode d'action antifongique**

Les huiles essentielles agissent sur la respiration de certaines levures (Cox et *al.*, 2000) et champignons filamenteux (Inouye et *al.*, 1998). Ils peuvent inhiber les enzymes responsables de la régulation de l'énergie ou de la synthèse des composés structuraux (Burt, 2004)

L'observation sous microscope électronique des cellules fongiques du genre *Candida* montre leur altération ultra structurale, augmentation du nombre de vésicules et perturbation de la division cellulaire (Nakamura et *al.*, 2004).

L'effet fongicide ou fongistatique des huiles essentielles sur les champignons filamenteux s'accompagne par des modifications morphologiques et une influence sur la morphogénèse hyphale (Bourrel et *al.*, 1995). Les cibles principales des huiles essentielles sont la paroi et les membranes cellulaire et nucléaire. Ils causent par conséquent une réduction de la production des spores et des aflatoxines (Rasooli et Owlia, 2005).

**PARTIE**  
**EXPÉRIMENTALE**

## I. Matériel végétal et extraction des huiles essentielles

Actuellement, malgré l'arsenal thérapeutique existant, peu de médicaments sont disponibles sur le marché et sont accessibles aux populations. De plus, le développement de phénomènes de résistance des parasites aux traitements actuels renforce le besoin urgent de trouver de nouveaux médicaments. Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité (Newman et *al.*, 2000).

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés de valoriser deux espèces végétales : *Warionia saharae* et *Pulicaria mauritanica*, qui poussent spontanément dans la région de Nâama.

Dans cette partie expérimentale nous présenteront les techniques utilisées dans ce travail :

- Extraction des huiles essentielles des différentes espèces végétales par hydrodistillation ;

- Caractérisation des huiles essentielles de ces plantes. Les analyses ont été réalisées dans le laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'université de Corse, par une application conjointe de plusieurs méthodes chromatographiques et spectroscopiques (Chromatographie en phase gazeuse (CPG-Ir), Chromatographie sur colonne de silice (CC), Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) et spectroscopie de la résonance magnétique du carbone 13 (RMN <sup>13</sup>C).

- Etude du pouvoir antibactérien et antifongique des huiles essentielle de ces espèces végétales *vis-à-vis* de 11 souches bactériennes appartenant au Gram (-) et Gram (+), une levure et quatre champignons filamenteux. Pour cela, nous avons évalué l'activité antimicrobienne des huiles essentielle en effectuant :

- La méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), qui permet d'évaluer rapidement l'activité antibactérienne des huiles essentielles des différentes plantes.

- Dans la confirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de contact direct, basée sur l'utilisation sous forme d'émulsion de ces produits qui sont non miscibles dans l'eau.

### I.1. Matériel végétal

La récolte des plantes a été effectuée dans la région de Nâama (ouest de l'Algérie) en période de pleine floraison (Tableau 1, Figure 5).

➤ *Warionia saharae*

La partie aérienne de *Warionia saharae* a été récoltée dans la wilaya de Nâama en novembre 2010 dans trois stations : Aïn Ourka, Moghrar, et Tiout.

➤ *Pulicaria mauritanica*

Les parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* ont été récoltées dans deux stations : Aïn Ourka et Aïn Sefra en novembre 2010 et en mai 2011. Par contre, les racines de cette même espèce ont été récoltées dans les mêmes stations mais, en novembre 2011.

Les différentes espèces ont été identifiées par le Professeur Marouf A. (Centre universitaire de Nâama). Les différentes plantes ont été classées dans notre laboratoire (Produits Naturels) et ont été enregistrées sous les références suivantes :

- A. 3031 pour *Warionia saharae*
- A. 2778 pour *Pulicaria mauritanica*

**Tableau (1) : Lieux des prélèvements des plantes, situation géographique et bioclimat des différentes stations d'étude**

Plantes	Stations	Etages bioclimatiques	Altitude (m)	Latitude (Nord)	Longitude (Ouest)
<i>Warionia saharae</i>	Aïn Ouarka	Aride, chaud	1058	32°46'	3°24'
	Moghrar	Aride, chaud	1033	32°29'	0°40'
	Tiout	Aride, chaud	1055	32°44'	3°24'
<i>Pulicaria mauritanica</i>	Aïn Ouarka	Aride, chaud	1058	32°46'	3°24'
	Aïn Sefra	Aride, chaud	970	32°45'	0°24'

## I.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

La distillation est la méthode la plus utilisée pour l'obtention des composés d'arômes volatiles. Nous avons utilisé la méthode d'hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles des différentes plantes. Le temps d'extraction est de trois heures. Le rendement des huiles essentielles est déterminé par le rapport entre la masse d'huile essentielle et la masse végétale sèche à traiter (Carré, 1953). Pour éviter leur dégradation, due à l'action de l'air ou de la lumière, nous avons conservé les huiles essentielles dans des petits flacons en verre fumé et au réfrigérateur à  $4 \pm 1^\circ \text{C}$

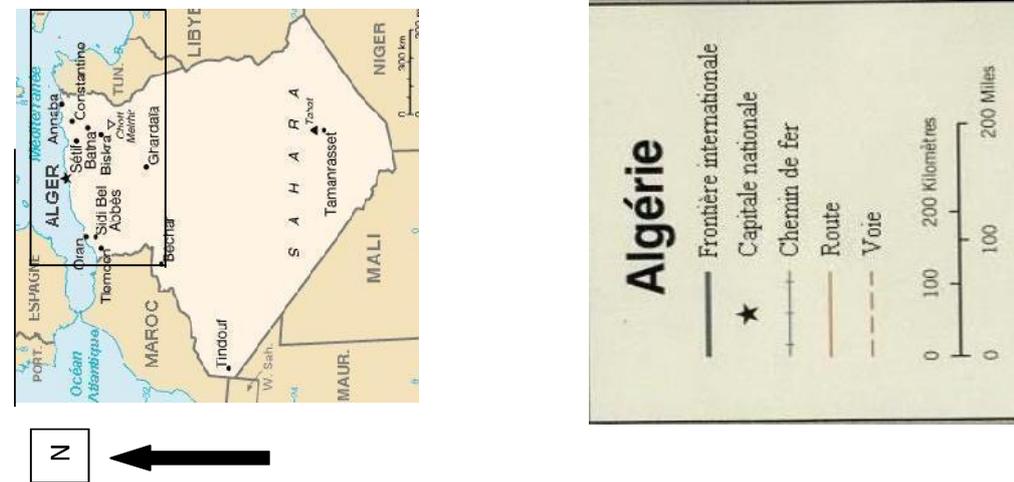


Figure (5) : Situation géographique des lieux des prélèvements

## II. Analyse des huiles essentielles

Les analyses des huiles essentielles des deux plantes par CPG-Ir et par RMN  $^{13}\text{C}$  ont été effectuées au laboratoire de « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse-CNRS.

### II.1. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

#### Conditions opératoires :

Les analyses chromatographiques en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer Clarus 500, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un injecteur diviseur, de deux colonnes capillaires de dimensions 50 m x 0,22 mm (épaisseur du film: 0,25  $\mu\text{m}$ ) :

- ✓ Une colonne polaire BP-20, polyéthylène glycol ;
- ✓ Une colonne apolaire BP-1, polyméthylsiloxane.
- Le gaz vecteur est l'hélium (0,8 ml/min), avec une pression en tête de colonne de 20 psi.
- La température de l'injecteur est de 250°C, celle du détecteur est de 250°C.
- La température linéaire est programmée depuis 60°C jusqu'à 220°C, à raison de 2°C/min, suivie d'un palier de 20 min à 220°C.
- Injection automatique : 0,1  $\mu\text{l}$  en mode Split (1/60).

#### Identification des constituants :

Les constituants ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (Ir) calculés par rapport à une série d'alcane ( $\text{C}_8\text{-C}_{28}$ ) avec interpolation linéaire sur les deux colonnes, avec ceux des composés de référence contenus dans la bibliothèque du laboratoire.

### II.2. Spectrométrie de Masse (SM)

Les huiles essentielles de ces plantes ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), réalisée au laboratoire de « Chimie des Produits Naturels » de l'université de Corse.

#### -a- Conditions opératoires :

Les huiles essentielles sont analysés à l'aide d'un chromatographe Perkin-Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue, de dimension 60 m x 0,22 mm, épaisseur du film 0,25  $\mu\text{m}$ ), Rtx-1 (polydiméthyl-siloxane), couplé à un détecteur de masse Perkin-Elmer TURBOMASS. Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation de 150°C par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique.

- Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min), exerçant une pression en tête de colonne de 43 psi.
- La température linéaire est programmée depuis 60°C jusqu'à 230°C, à raison de 2°C/min, suivie d'un palier de 45 min à 230°C
- Spectre de masse à ionisation électrique obtenu au-dessus d'un intervalle de 35-350 Da.
- Injection automatique : 0,2 µl en mode Split (1/80).

**-b- Conditions opératoires :**

Les huiles essentielles sont analysés à l'aide d'un chromatographe Agilent Technologie 5975C doté d'un injecteur automatique et d'une colonne capillaire de silice fondue, de dimension (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm), HP-MS 5% phénylméthylsiloxane, couplé à un détecteur de masse Agilent Technologie 7890A. Les molécules sont bombardées dans une source d'ionisation de 150°C par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique.

- Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/min), exerçant une pression en tête de colonne de 43 psi.
- La température linéaire est programmée depuis 60°C jusqu'à 250°C, à raison de 4°C/min, suivie d'un palier de 52,5 min à 250°C
- Spectre de masse à ionisation électrique obtenu au-dessus d'un intervalle de 35-350 m/z.
- Injection automatique : 0,2 µl en mode Split (1/80).

**-c- Spectrométrie de masse « à temps de vol » (TOF = time of flight).**

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Agilent Technologie 6890 couplé à un TOF-SM Waters GCT Premier, équipé d'une colonne (30 m x 0,25 mm de diamètre, épaisseur du film 0,25 µm), DB-5MS UI. Le volume d'injection : 1µl en mode split ; la température du four est programmé à partir de 60°C (1min) à 320°C (25°C/min), suivie d'un palier de 10 min à 320°C. La température de la transfert-ligne est à 250°C et celle de la source de température à 200°C. Le spectromètre de masse opère en mode impact électronique (IE) (ionisation d'énergie, 70 eV). La Tension plaque multicanal a été fixé à 2600 V. La fréquence d'acquisition à 10 spectres/s (soit 5 spectres/s avec mode « Amélioration de la gamme dynamique »). L'acquisition a été effectuée en mode de balayage intégral avec une plage de balayage de 50-550 m/z. L'étalonnage a été réalisé avec l'heptacosane comme référence.

La masse de la résolution est environ 5000 FWHM pour 218,9856 m/z. Au cours des acquisitions, un étalon interne, le pentafluorobromobenzène a été introduit en continu dans la source EI, à partir d'un réservoir de référence à 50°C et à travers un orifice d'entrée de référence à 120°C. La masse m/z 181,0077 a été utilisée comme masse de verrouillage. Les données ont été traitées avec le logiciel MassLynx 4.1 (Waters).

#### **Identification des constituants :**

La méthode d'identification est basée sur la comparaison du spectre de masse, obtenu pour chacun des composés de l'huile essentielle lors de la fragmentation de nos solutés, avec une banque de spectres de produits de référence (Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; National Institute of Standards and Technology, 1999 ; König *et al.*, 2001 ; Adams, 2001).

### **II.3. Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13 (RMN <sup>13</sup>C)**

La RMN du <sup>13</sup>C selon la méthode mise au point et développée par l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse (Tomi *et al.*, 1995), est basée sur la comparaison des déplacements chimiques des carbones du mélange avec ceux des produits de référence enregistrés dans des conditions expérimentales (solvant, dilution) rigoureusement identiques à celles des huiles essentielles et stockés dans des bibliothèques de spectres propres au laboratoire.

#### **Conditions opératoires :**

Les spectres RMN ont été enregistrés dans le chloroforme deutéré, sur un spectromètre de marque « Bruker AVANCE 400 », opérant à 100,623 MHz pour le carbone 13, sous les conditions opératoires suivantes : Sonde de 5 mm, durée d'impulsion (PW) : 4  $\mu$ s (angle 45°), temps d'acquisition : 2,7 s correspondant à une acquisition de 128 K avec une largeur spéciale (SW) de 24 000 Hz (240 ppm), résolution digitale : 0,183 Hz/pt, mode de découplage pulsé (Composite Phase Decoupling). Le nombre d'accumulation est compris entre 2 000 et 3 000 pour chaque enregistrement. Les déplacements chimiques sont des données en ppm ( $\delta$ ) (Tétraméthylsilane) par rapport au TMS pris comme référence interne. L'analyse d'un mélange est menée sur un échantillon de 40 mg dilué dans 0,5 ml de CDCl<sub>3</sub>. Les données du signal de précession libre (FID) sont multipliées avant la Transformée de Fourier par une fonction exponentielle (LB=1,0 Hz).

#### **Identification des constituants :**

L'identification est réalisée par la prise en compte du nombre de pics observés par rapport à ceux attendus pour chaque molécule, du nombre de superpositions des signaux et des variations des déplacements chimiques des carbones dans les spectres du mélange par rapport aux valeurs de référence ( $\Delta\delta$ ). En plus de ces paramètres qui sont directement accessibles par un logiciel élaborés au laboratoire de « Chimie et Biomasse » à l'université de Corse (Tomi *et al.*, 1995 ; Rezzi *et al.*,

2002 ; Tomi et Casanova, 2006 ; Bighelli et Casanova, 2009), l'intensité des raies de résonance permet de contrôler l'appartenance d'un déplacement chimique à un composé donné. Cette technique permet l'identification de différents composants à une teneur supérieure ou égale à 0,3-0,4% sans purification précédente.

#### II.4. Chromatographie sur colonne de silice

Dans l'optique de mener une analyse plus approfondie et donc d'identifier un plus grand nombre de composés pour l'huile essentielle des racines de *Pulicaria mauritanica*, il était nécessaire de combiner un fractionnement sur colonne ouverte de silice avec des analyses par CPG-Ir, CPG/SM et RMN du carbone-13.

La chromatographie sur colonne de silice (CC) de type « flash » a été réalisée avec de la silice ICN (200-500  $\mu\text{m}$ , 40 g) sur 1,707 g d'huile essentielle des racines de *Pulicaria mauritanica* en utilisant un gradient de solvants pentane : éther diéthylique de 100:0 à 0:100. Nous avons ainsi obtenu six fractions (F1-F6) dont les poids sont respectivement : 52 mg ; 701 mg ; 266 mg ; 233 mg ; 165 mg et 268 mg. La fraction F3 contenant des composés moyennement polaire a été de nouveau soumise à un fractionnement sur colonne ouverte de silice (ICN 63-200  $\mu\text{m}$ , 6 g), imprégnée avec 1,2 g d' $\text{AgNO}_3$  (20%) en utilisant le pentane : acétate d'éthyle (120 : 1). Trois fractions F3.1-F3.3 (23, 178, 67, respectivement) ont été éluées. La fraction F3.2 a été soumise à une chromatographie sur gel de silice (63-200  $\mu\text{m}$ , 4 g) en utilisant un gradient de solvant pentane : diéthyle éther de polarité croissante, donnant deux sous-fractions F3.2a (17 mg) et F3.2b (23 mg). La fraction F5 a été fractionnée de nouveau avec P : DE (100 :1) sur gel de silice (63-200  $\mu\text{m}$ , 4 g) et a abouti à F5.2 (12 mg) et F5.2 (125 mg). Enfin la fraction F6 a été fractionnée sur gel de silice (63-200  $\mu\text{m}$ , 6 g) avec P : DE (90 :10 à 0 :100), aboutissant à quatre sous fractions : F6.1-F6.4 (47, 69, 21 et 25 mg, respectivement) (Figure 13).

### III. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Dans l'antiquité, les extraits volatils des plantes médicinales sont recherchés, non seulement pour l'assaisonnement des cuissons et pour rendre plus agréable des bains et l'eau de toilette, mais également et surtout en raison de leurs pouvoir antiseptiques et antimicrobiens (Newman et *al.*, 2000).

La nouvelle démarche consiste à s'intéresser à la recherche d'un principe actif dans les produits naturels d'origine végétal, plus particulièrement les métabolites secondaires à savoir les huiles essentielles, issues des plantes médicinales aromatiques qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies et pour améliorer santé et bien être. Pour cela, nous avons voulu étudier

le pouvoir antibactérien et antifongique des huiles essentielles des deux plantes *Warionia saharae* et *Pulicaria mauritanica* vis-à-vis de certaines bactéries et champignons.

### III.1. Souches bactériennes et fongiques testées

Les souches pathogènes utilisées sont présentes dans le tableau (2). Elles sont parmi ceux qui causent les maladies les plus courantes.

**Tableau (2) : Les différentes souches microbiennes testées**

<b>Souches microbiennes testées</b>
<p><b>Bactéries :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><i>Bactéries à Gram positif</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</li> <li><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</li> <li><i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303</li> <li><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313</li> </ul> </li> <li>• <b><i>Bactéries à Gram négatif</i></b> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</li> <li><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</li> <li><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603</li> <li><i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047</li> <li><i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659</li> <li><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311</li> <li><i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090</li> </ul> </li> </ul> <p><b>Levure :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Candida albicans</i> ATCC 26790</li> </ul> <p><b>Moisissures :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Cladosporium herbarum</i> MNHN 3369</li> <li><i>Fusarium oxysporum</i> MNHN 963917</li> <li><i>Alternaria alternata</i> MNHN 843390</li> <li><i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294</li> </ul>

### III.2. Méthodes d'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Dans un premier temps, nous avons testé les huiles essentielles des deux espèces végétales vis-à-vis des souches bactériennes par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale (CMI) en milieu solide.

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

Afin de tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, nous avons utilisé la méthode de l'antibiogramme par diffusion à partir de disques imprégnés. Pour effectuer ce test, une culture bactérienne confluite est réalisée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose Mueller-Hinton. Ce milieu est riche en composé d'infusion de viande de bœuf, d'hydrolysat acide de caséine, d'amidon de maïs. Les disques imprégnés d'une dose connue d'huile essentielle sont déposés à la surface de la gélose. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet de déduire les caractères de sensibilité de la souche bactérienne.

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37±1° C pour les bactéries et 30±1°C pour la levure pendant 24 h, puis ensemencées sur boîtes contenant de la gélose nutritive pour vérifier leur pureté.

Après 24h d'incubation à 37±1°C pour les bactéries et 30±1°C pour la levure, les souches sont ensemencées sur bouillon nutritif puis incubées à 37±1°C pour les bactéries et 30±1°C pour la levure pendant 18 h. De cette dernière culture, on prélève quelques gouttes et on les met dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension microbienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est ajustée entre 0,08 et 0,10, soit environ 10<sup>8</sup> UFC/ml pour les bactéries (Pessini et *al.*, 2003) et une densité optique entre 0,08 et 0,10 à 530 nm, soit environ 1 à 5×10<sup>6</sup> UFC/ml pour la levure (Pfaller et *al.*, 1988).

La suspension bactérienne est ensuite diluée à 1/10 pour les staphylocoques et à 1/100 pour les autres souches bactériennes.

Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre imprégnés de 15 µl d'huile essentielle et 5 µl de DMSO, sont déposés à la surface du milieu gélosé Mueller – Hinton, en boîte de Pétri, préalablement ensemencées en surface en nappe avec 1 ml d'inoculum et l'excédant est éliminé par aspiration (Joffin et Leyral, 2001).

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par le DMSO (20 µl) et des témoins positifs : antibiotiques (Ampicilline (10µg/disque) et oxacilline (1µg/disque)) ; antifongique (nystatine (30 µg/disque)).

Les boîtes sont incubées à  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , pendant 24 heures pour les bactéries et à  $30\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 48 h pour la levure. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, disque inclus.

### III.2.2. Méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI correspond à la concentration provoquant l'absence de croissance d'une population initiale de bactéries détectables par les moyens naturels en 24 heures. Cette technique consiste à mettre en culture les bactéries sur des boîtes avec une gamme de concentration croissante d'huile essentielle.

Pour déterminer la CMI, l'huile essentielle est disposée dans chaque boîte afin d'effectuer une gamme de concentration de 2- 6  $\mu\text{l/ml}$  avec pour chacune, son équivalent en DMSO. Puis 20 ml de gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure, stérile en surfusion sont ajoutés. Le mélange est alors homogénéisé et on laisse refroidir. Après une durée d'incubation de 24h à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pour les bactéries et  $30\pm 1^\circ\text{C}$  pour la levure, la lecture des résultats se fait par présence ou absence de croissance bactérienne.

### III.2.3. Etude du pouvoir antifongique

Pour les champignons filamenteux, il est habituel d'utiliser des suspensions des spores et du mycélium. Or, les études *in vitro* ont montré que les résultats diffèrent selon que l'on utilise des spores ou des filaments. L'agent pathogène est souvent sous forme de filaments chez le malade, il devient délicat d'interpréter un résultat obtenu *in vitro* avec des spores (Ouraini et al., 2007).

La technique utilisée est la technique de contact direct en milieu gélosé (Kordali et al., 2005; Kordali et al., 2007). On prépare une gamme de concentrations finale d'huile essentielle (2 - 10  $\mu\text{l/ml}$ ), avec pour chacune, son équivalent en DMSO. La concentration finale du DMSO ne dépasse pas 2%. Puis, 20 ml du milieu PDA, stériles en surfusion sont ajoutés. Ce mélange est coulé dans des boîtes de Pétri. Ensuite, on inocule au centre de ces boîtes des disques de mycélium de chaque moisissure de 6 mm de diamètre prélevés d'une culture de 5 à 7 jours. Les boîtes sont incubées à  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , pendant 3 à 5 jours. Les boîtes de Pétri contenant du DMSO ont été utilisés comme contrôle négatif, et ceux contenant la nystatine comme contrôle positif (2-7,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Les CMI ont été déterminées comme étant la concentration où on n'a pas une croissance visible. Quand il n'y a pas de croissance du mycélium, ce dernier est transféré dans une autre boîte de Pétri contenant du PDA, puis incubé à  $25\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 3 à 5 jours, afin de déterminer si l'huile essentielle a un effet fongistatique ou fongicide.

#### **IV. Analyse statistique**

Les analyses en Composantes Principales (ACP) ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT-PRO (Thierry Fahmy, France). La classification des échantillons à été effectuée par l'utilisation de l'algorithme de partition des centres de groupes (Program K-means, Legendre P, Université de Montréal, Département des Sciences Biologiques, 1999).

**PARTIE**  
**RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## I. *Warionia saharae*

*Warionia saharae* Benth. & Hook. est une plante endémique poussant à l'état spontané dans la région de Nâama (Algérie). La composition chimique de l'huile essentielle de *W. saharae* a fait l'objet de quelques publications. En effet, l'huile essentielle de *W. saharae* est caractérisée par la présence majoritaire du  $\beta$ -eudesmol, (*E*)-nérolidol suivi de linalol. Ces trois composés sont les constituants les plus abondants dans l'huile essentielle de *W. saharae* collectées dans différentes régions au Maroc (Ramaut et al., 1985 ; Essaqui et al., 2007 ; Znini et al., 2011 ; Sellam et al., 2012 ; Amezouar et al., 2012 ; Znini et al., 2013a). Par contre, l'huile essentielle de *W. saharae* récoltée en Algérie a fait l'objet d'une seule étude (Belboukhari et al., 2008). Ces auteurs rapportent une composition chimique qui diffère radicalement de celles mentionnées précédemment. Les principaux composés sont :  $\alpha$ -caryophyllène (33,65%),  $\delta$ -cadinène (27,93%).

Ainsi, le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de cette espèce végétale à travers la caractérisation de la composition chimique et étude du pouvoir antimicrobien de ses huiles essentielles. Pour cela, la récolte de cette plante a été réalisée en novembre (période de floraison) dans trois stations de la région de Nâama : Aïn Ourka (6 échantillons), Tiout (5 échantillons) et Moghrar (5 échantillons).

### I.1. Rendements en huiles essentielles des différentes stations

Les huiles essentielles des parties aériennes de cette espèce végétale sont obtenues par hydrodistillation. Elles sont d'aspect liquide, de couleur verdâtre et caractérisée par une forte odeur. Les rendements sont calculés par rapport à la matière végétale sèche et représentés dans le tableau (3).

**Tableau (3) : Rendements (en %) en huiles essentielles de *Warionia saharae* des différentes stations**

Echantillons	Rendements (%)	Echantillons	Rendements (%)	Echantillons	Rendements (%)
<b>AO1</b>	0,50	<b>T1</b>	0,30	<b>M1</b>	0,39
<b>AO2</b>	0,57	<b>T2</b>	0,23	<b>M2</b>	0,40
<b>AO3</b>	0,57	<b>T3</b>	0,20	<b>M3</b>	0,35
<b>AO4</b>	0,57	<b>T4</b>	0,50	<b>M4</b>	0,41
<b>AO5</b>	0,57	<b>T5</b>	0,45	<b>M5</b>	0,35
<b>AO6</b>	0,57	/	/	/	/
<b>Moyenne</b>	0,56	<b>Moyenne</b>	0,34	<b>Moyenne</b>	0,38

(Les stations : AO : Aïn Ourka ; T : Tiout ; M : Moghrar)

Nous avons noté que le rendement en huiles essentielles de *Warionia saharae* est faible variant de 0,20 - 0,57%. On constate également que *W. saharae* de provenance d'Aïn Ourka est la plus riche en huile essentielle. Par contre, le rendement diffère légèrement entre les stations de Tiout et Moghrrar.

La teneur en huiles essentielles de *W. saharae* de provenance des différentes stations du Maroc varie de 0,5 % à 1,20%. Ces rendements sont nettement plus importants que les nôtres (Ramaut et al., 1985 ; Essaqui et al., 2007 ; Znini et al., 2011 ; 2013a). En outre Amezouar et al. en 2012, avancent que la teneur en huile essentielle, obtenue par hydrodistillation, de cette même espèce récoltée dans la région de Tata (Maroc) est de l'ordre de 0,6%. Cette valeur est très proche de nos résultats.

## **I.2. Analyse des huiles essentielles de *Warionia saharae***

Afin de contribuer à la caractérisation de l'huile essentielle de *W. saharae*

- Nous avons procédé, en premier lieu, à une analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle en appliquant une CPG(Ir), RMN  $^{13}\text{C}$  et une CPG/SM ;
- Ensuite, pour mettre en évidence l'existence d'un éventuel polymorphisme chimique, 16 échantillons d'huile essentielle ont été préparés et analysés par CPG(Ir) et RMN  $^{13}\text{C}$ . Les résultats obtenus ont ensuite été soumis à un traitement statistique.

### **I.2.1. Analyse détaillée de l'huile essentielle de *Warionia saharae***

Un échantillon de l'huile essentielle de *Warionia saharae* a été analysé en combinant une méthode chromatographique (CPG-Ir) et deux méthodes spectrométriques (RMN  $^{13}\text{C}$ , CPG/SM).

La caractérisation de l'huile essentielle de cet échantillon a été réalisée par RMN  $^{13}\text{C}$  sans séparation préalable des constituants. Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. Elle nous a permis d'identifier quatorze composés (10 monoterpènes et 4 sesquiterpènes) qui représente 82,7% de la composition chimique globale (Tableau (4)). Les constituants identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$ , sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés.

Tableau (4) : Composés identifiés par RMN <sup>13</sup>C dans l'huile essentielle de *W. saharae*

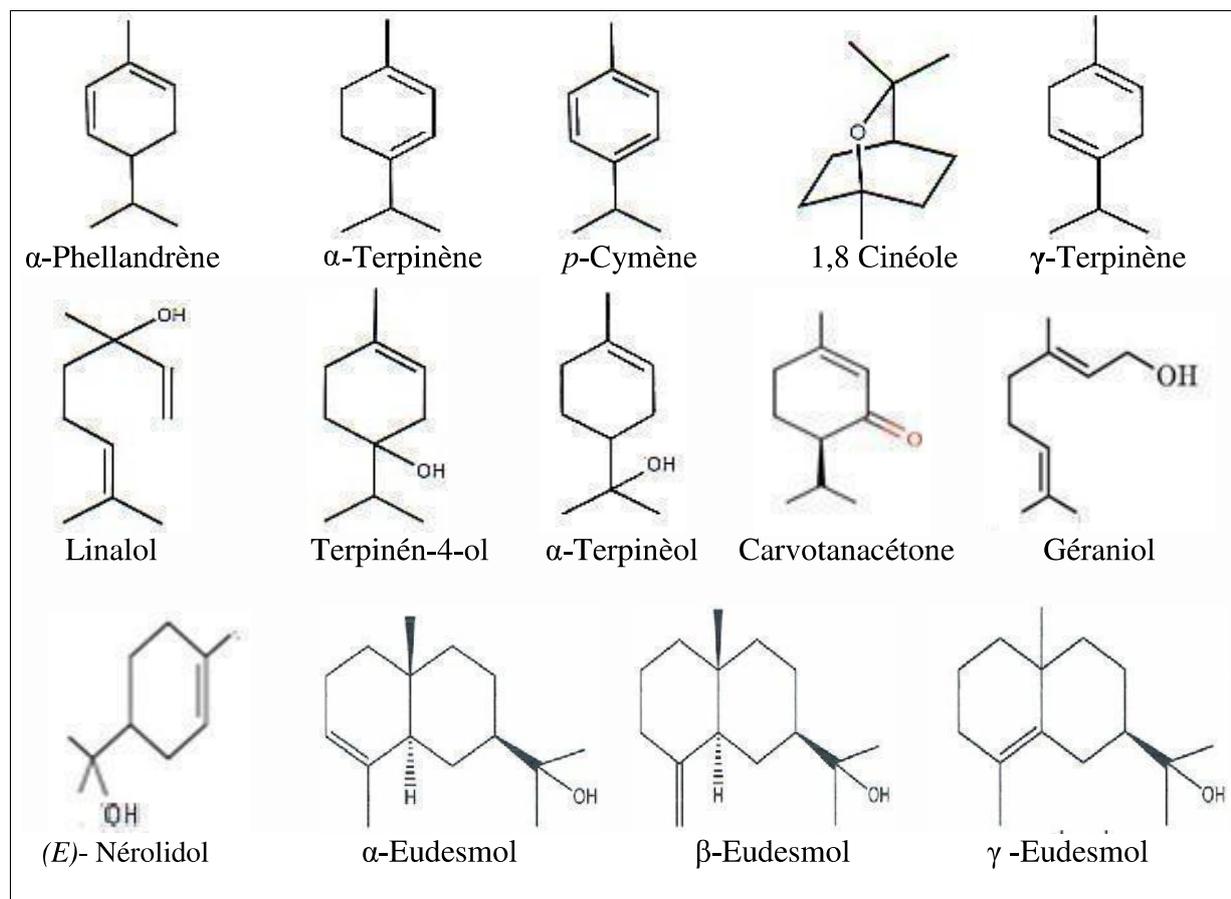
Composés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	%	RMN	SUP
$\alpha$ -Phellandrène	997	1164	0,8	8/10	2
$\alpha$ -Terpinène	1008	1268	0,6	7/9	3
<i>p</i> -Cymène	1011	1209	1,2	5/7	2
1,8-Cinéole	1020	1243	2,6	5/7	2
$\gamma$ -Terpinène	1047	1243	1,2	7/9	3
<b>Linalol</b>	1081	1544	<b>17,1</b>	7/10	2
Terpinèn-4ol	1159	1597	1,5	9/10	1
$\alpha$ -Terpinéol	1171	1691	1,6	10/10	2
Carvotanacétone*	1220	1673	2,2	7/10	2
Géraniol*	1232	1837	0,6	8/10	2
<b>(E)- Nérolidol</b>	1546	2037	<b>25,7</b>	12/14	1
$\gamma$ -Eudesmol	1620	2167	1,3	15/15	0
<b><math>\beta</math>-Eudesmol</b>	1642	2233	<b>25,0</b>	14/15	1
$\alpha$ -Eudesmol	1646	2218	1,3	12/15	0
Total (%)	<b>82,7</b>				

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire). Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20). RMN : nombre de carbones observés par rapport au nombre de pics attendus. SUP : nombre de superpositions.

Cette huile essentielle est riche en sesquiterpènes oxygénés qui représentent 53,3% de la composition chimique globale. Elle contient 4 composés sesquiterpéniques oxygénés avec prédominance du (*E*)-nérolidol (25,7%) et du  $\beta$ -eudesmol (25,0%). Deux autres sesquiterpènes sont présents en faibles teneurs, soient, le  $\gamma$ -eudesmol (1,3%) et le  $\alpha$ -eudesmol (1,3%). Cette huile essentielle contient également quatre monoterpènes oléfiniques (3,8%) et six monoterpènes oxygénés (25,6%). Le linalol est le composé monoterpénique oxygéné majoritaire de l'ordre de 17,1%. Deux autres monoterpènes oxygénés sont mis en évidence en quantités appréciables, soit le 1,8-cinéole (2,6%) et la carvotanacétone (2,2%).

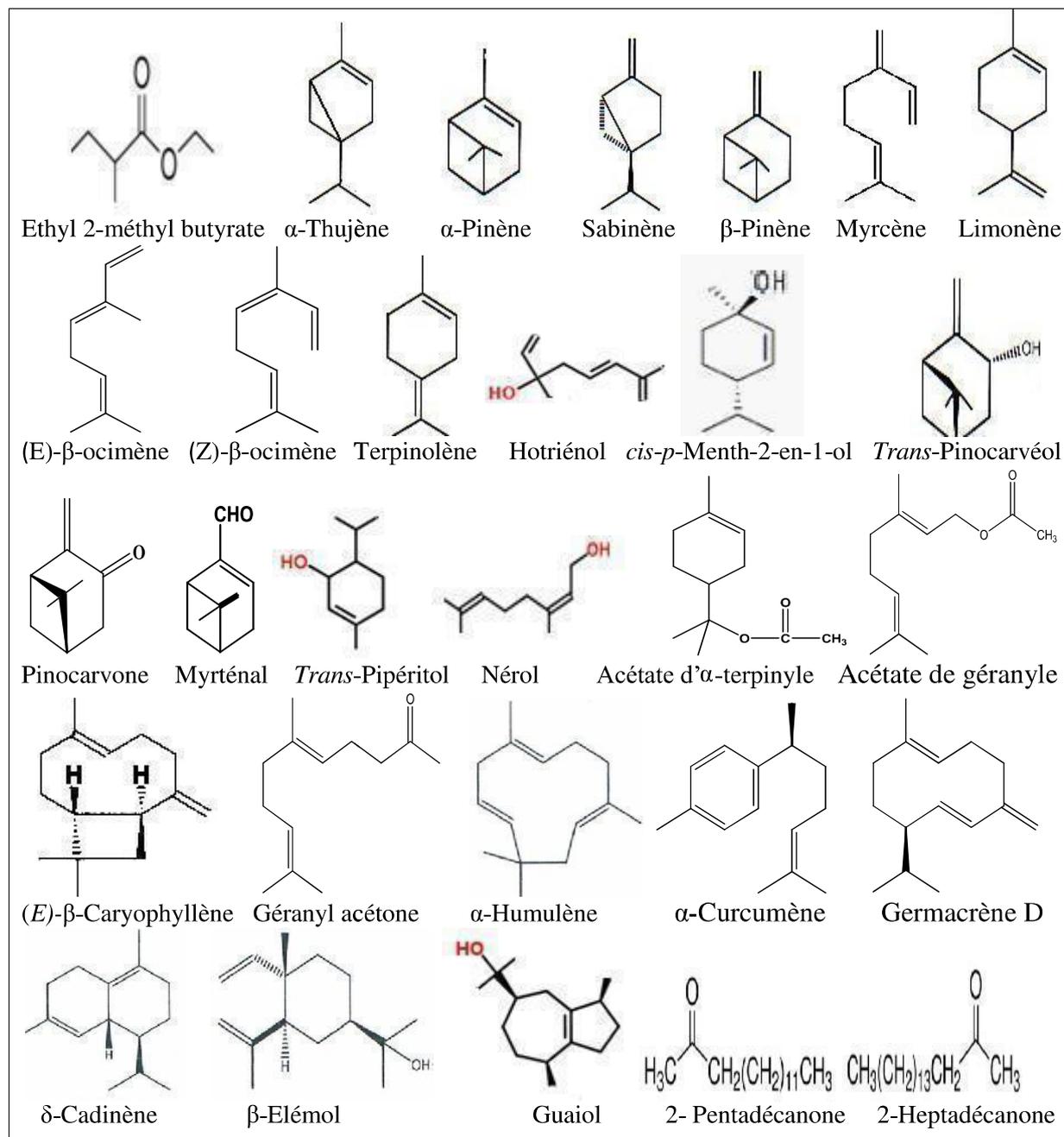
Le spectre RMN <sup>13</sup>C de l'huile essentielle de *W. saharae* de cet échantillon est reproduit sur la figure présentée en annexe 8.

Dans la figure (6), nous illustrons la structure des molécules identifiées lors de l'analyse de cette huile essentielle.



**Figure (6) : Structure des composés identifiées par RMN  $^{13}\text{C}$  dans l'huile essentielle de *Warionia saharae***

L'application de la CPG/SM, pour l'analyse de cet échantillon, nous a permis d'identifier 29 autres composés minoritaires de teneurs très faibles qui ne peuvent pas être identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Une fois identifiés, ces composés sont aisément repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire, ce qui permet leur quantification. Leurs structures sont données dans la figure (7). Dix neuf de ces composés sont des monoterpènes dont 7 de nature oléfinique, et le reste de nature oxygéné. Les 6 sesquiterpènes identifiés dont 4 sont des oléfines et les autres sont des sesquiterpènes oxygénés.



**Figure (7) : Composés identifiés par CPG/SM dans l'huile essentielle de *W. saharae***

En conclusion, nous avons identifié, au total, 43 composés dans les huiles essentielles de *Warionia saharae* représentant 89,2% de la composition chimique globale (Tableau (5)).

**Tableau (5) : Composition chimique de l'huile essentielle d'un échantillon de *Warionia saharae***

COMPOSES	Ir lit <sup>b</sup>	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	%	Mode d'identification	
1. Ethyl 2-méthyl butyrate	843	830	nd	0,2	RI	MS
2. $\alpha$ -Thujène	932	930	1014	0,3	RI	MS
3. $\alpha$ -Pinène	936	937	1011	0,3	RI	MS
4. Sabinène	973	970	1127	0,1	RI	MS
5. $\beta$ -Pinène	978	978	1112	Tr	RI	MS
6. Myrcène	987	980	1160	0,2	RI	MS
7. $\alpha$ -Phellandrène	1002	996	1166	0,8	RI	MS
8. $\alpha$ -Terpinène	1013	1009	1181	0,6	RI	MS
9. <i>p</i> -Cymène	1015	1011	1270	1,2	RI	MS
10. 1,8-Cinéole	1024	1020	1210	2,6	RI	MS
11. Limonène	1025	1020	1201	0,2	RI	MS
12. (Z)- $\beta$ -Ocimène	1029	1030	1225	Tr	RI	MS
13. (E)- $\beta$ -Ocimène	1041	1035	1249	0,1	RI	MS
14. $\gamma$ -Terpinène	1051	1048	1245	1,2	RI	MS
15. Terpinolène	1082	1078	1282	0,4	RI	MS
<b>16. Linalol *</b>	1086	1083	1542	<b>17,1</b>	RI	MS
17. Hotriénol *	1083	1083	1566	0,3	RI	MS
18. <i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	1108	1106	1549	Tr	RI	MS
19. <i>Trans</i> -Pinocarvéol	1126	1121	1650	Tr	RI	MS
20. Pinocarvone	1137	1144	1565	0,1	RI	MS
21. Terpinèn-4-ol	1164	1161	1596	1,5	RI	MS
22. $\alpha$ -Terpinéol	1176	1171	1689	1,6	RI	MS
23. Myrténal	1172	1177	1624	0,2	RI	MS
24. <i>Trans</i> -Pipéritol	1193	1191	1752	Tr	RI	MS
25. Nérol	1210	1203	1793	0,5	RI	MS
26. Carvotanacétone *	1220	1218	1673	2,2	RI	MS
27. Géraniol *	1220	1218	1840	0,6	RI	MS
28. Acétate d' $\alpha$ -terpinyle	1335	1330	1684	0,5	RI	MS
29. Acétate de géranyle	1362	1360	1744	0,1	RI	MS
30. (E)- $\beta$ -Caryophyllène	1421	1415	1594	0,1		MS
31. Géranyl Acétone	1430	1430	1865	0,1	RI	MS
32. $\alpha$ -Humulène	1455	1465	1665	0,3	RI	MS
33. $\alpha$ -Curcumène	1480	1479	1714	0,2	RI	MS
34. Germacrène D	1487	1487	1752	0,5	RI	MS
35. $\delta$ -Cadinène	1520	1512	1752	0,4	RI	MS
36. $\beta$ -Elémol	1541	1532	2070	0,2	RI	MS
<b>37. (E)-Nérolidol</b>	1553	1547	2034	<b>25,7</b>	RI	MS
38. Guaiol	1593	1587	2093	0,1	RI	MS
39. $\alpha$ -Eudesmol	1618	1616	2166	1,3	RI	MS
<b>40. <math>\beta</math>-Eudesmol</b>	1641	1635	2219	<b>25,0</b>	RI	MS
41. $\gamma$ -Eudesmol	1653	1639	2234	1,3	RI	MS
42. 2- Pentadécaneone	1688	1676	2013	0,5	RI	MS
43. 2-Heptadécaneone	1884	1880	2223	0,3	RI	MS
<b>Total (%)</b>				<b>89,2</b>		

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire). Ir lit<sup>b</sup> : indices de rétention prises dans la littérature (Terpenoids Library). Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et sur colonne polaire (BP20). Tr : trace ; nd : non déterminé.

Cette huile essentielle est riche en sesquiterpènes oxygénés (53,6%) suivis par les monoterpènes oxygénés (27,7%). Comme indiqué dans la littérature concernant la composition chimique des huiles essentielles de *W. saharae* récoltée dans différentes régions au Maroc, les composés majoritaires sont également le (*E*)-nérolidol (25,7%), le  $\beta$ -eudesmol (25,0%) et le linalol (17,1%). Divers monoterpènes oxygénés possédant un squelette p-menthane sont présents en quantités appréciables : 1,8-cinéole (2,6%), carvotanacétone (2,2%),  $\alpha$ -terpinéol (1,6%) et terpinén-4-ol (1,5%). Les cinq monoterpènes acycliques identifiés (hotriénol, acétate de géranyl, acétone de géranyle, nérol et géraniol) sont présents en faibles teneurs soit entre 0,1 et 0,6%. Un monoterpène linéaire est également identifié en très faibles teneurs, soit : l'éthyl-2-méthyl butyrate (0,2%). Deux composés déjà mentionnés dans les travaux de Znini et *al.* en 2011 et Znini et *al.* en 2013a, sont aussi identifiés. Il s'agit : du 2-pentadécane (0,5%) et du 2-heptadécane (0,3%).

### **I.2.2. Etude de la variabilité intraspécifique de l'huile essentielle de *W. saharae***

La relation particulière existant entre la composition chimique d'une part et les caractères botaniques d'autre part, a donné naissance à une discipline et à une classification très utile « la chimiotaxonomie » (Anton et Wichtl, 1999).

Dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, nous avons analysé 16 échantillons d'huile essentielle préparée à partir de la partie aérienne. Ceux-ci proviennent de trois stations qui sont : (Moghrar (M1 à M5), Aïn Ourka (AO1 à AO6) et Tiout (T1 à T5). Tous les échantillons d'huile essentielle ont été analysés par CPG(Ir) et par RMN  $^{13}\text{C}$ . Ainsi, sur l'ensemble des échantillons, nous avons identifié 43 constituants représentant 88,7 % à 90,7 % de la composition globale (Annexe 1), nous rapportons dans le tableau (6) les teneurs des douze constituants majoritaires. Les échantillons analysés sont qualitativement très proches. Par contre, nous remarquons une variabilité chimique quantitative particulièrement pour les composés suivants :  $\beta$ -eudesmol (17,6-32,9%), (*E*)-nérolidol (15,8-30,4%) et le linalol (15,3-32,1%). Ces huiles essentielles renferment également des monoterpènes oxygénés en quantités appréciables à savoir : carvotanacétone (0,7-9,3%), géraniol (0,8-3,7%),  $\alpha$ -terpinéol (1,2-3,7%) et 1,8-cinéole (0,8-2,6%).

**Tableau (6) : Composés majoritaires identifiés dans les 16 échantillons d'huile essentielle de *W. saharae***

Composés identifiés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	Moyenne ± Ecart type	Minimum (%)	Maximum (%)
<i>p</i> -Cymène	1011	1209	0,6 ± 0,3	0,2	1,2
1,8-Cinéole	1020	1243	1,4 ± 0,5	0,8	2,6
$\gamma$ -Terpinène	1047	1243	0,6 ± 0,3	0,2	1,3
Linalol	1081	1544	22,1 ± 5,4	15,3	32,1
Terpinèn-4-ol	1161	1596	1,1 ± 0,5	0,5	2,0
$\alpha$ -Terpinéol	1171	1691	1,9 ± 0,7	1,2	3,7
Carvotanacétone	1218	1673	2,3 ± 2,3	0,7	9,0
Géranol	1232	1837	1,7 ± 1,0	0,8	3,7
( <i>E</i> )-Nérolidol	1546	2037	24,7 ± 4,5	15,8	30,5
$\gamma$ -Eudesmol	1620	2167	1,2 ± 0,3	0,8	1,6
$\beta$ -Eudesmol	1642	2233	25,3 ± 5,0	17,6	32,9
$\alpha$ -Eudesmol	1646	2218	1,4 ± 0,1	1,2	1,5

Ainsi nos résultats sont bien en accord avec les données (Tableau (7)) décrites dans la littérature (Ramaut et *al.*, 1985 ; Amezouar et *al.*, 2012 ; Znini et *al.*, 2011 ; 2013a), en particulier, pour les pourcentages en  $\beta$ -eudesmol et en (*E*)-nérolidol. Cependant un échantillon de provenance de Tata (Maroc) est caractérisé par une forte teneur en  $\beta$ -eudesmol (52,7%). De même, les pourcentages en linalol dans nos échantillons sont plus élevés que ceux observés dans presque tous les échantillons récoltés au Maroc. Enfin, la composition chimique de l'huile essentielle de *W. saharae* récoltée en Algérie et rapporté par Belboukhari et *al.* (2008) diffère totalement de nos échantillons. En effet, les composés majoritaires sont :  $\alpha$ -caryophyllan (33,65%) et  $\delta$ -cadinène (27,93%).

**Tableau (7) : Composés majoritaires dans l'huile essentielle de *W. saharae* des différentes régions**

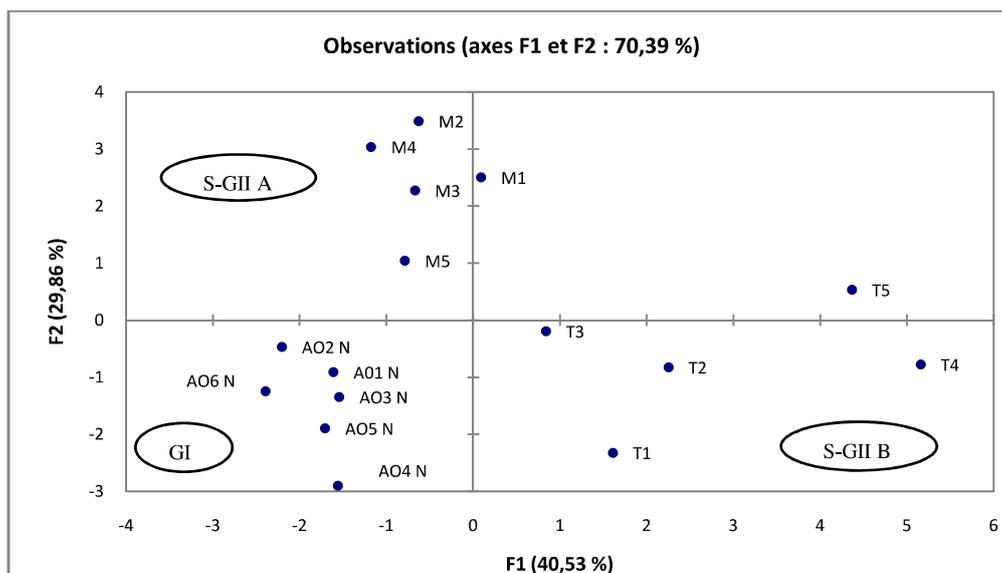
Composés	Ramaut et <i>al.</i> , 1985 (Maroc)	Essaqui et <i>al.</i> , 2004 (Maroc)	Belboukhari et <i>al.</i> , 2008 (Algérie)	Znini et <i>al.</i> , 2011 ; 2013 (Maroc)	Amezouar et <i>al.</i> , 2012 (Maroc)	Gherib et <i>al.</i> , 2014 (Algérie)
$\beta$ -Eudesmol	42,25 %	52,7 %	-----	30,0-45,6%	38,12 %	17,6-32,9 %
( <i>E</i> )-Nérolidol	17,26 %	17,40 %	-----	8,6-31,5%	25,95 %	15,8-30,4 %
Linalol	8,63 %	5,10 %	-----	12,5-19,3%	-----	15,3-32,1 %
$\alpha$ -Caryophyllan	-----	-----	33,65 %	-----	-----	-----
$\delta$ -Cadinène	-----	0,8 %	27,93 %	0,1 %	-----	-----
$\beta$ -Guaiène	-----	-----	6,27 %	-----	-----	-----

Afin d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage et de pouvoir mettre en évidence une éventuelle variabilité chimique, les compositions des 16 échantillons d'huile

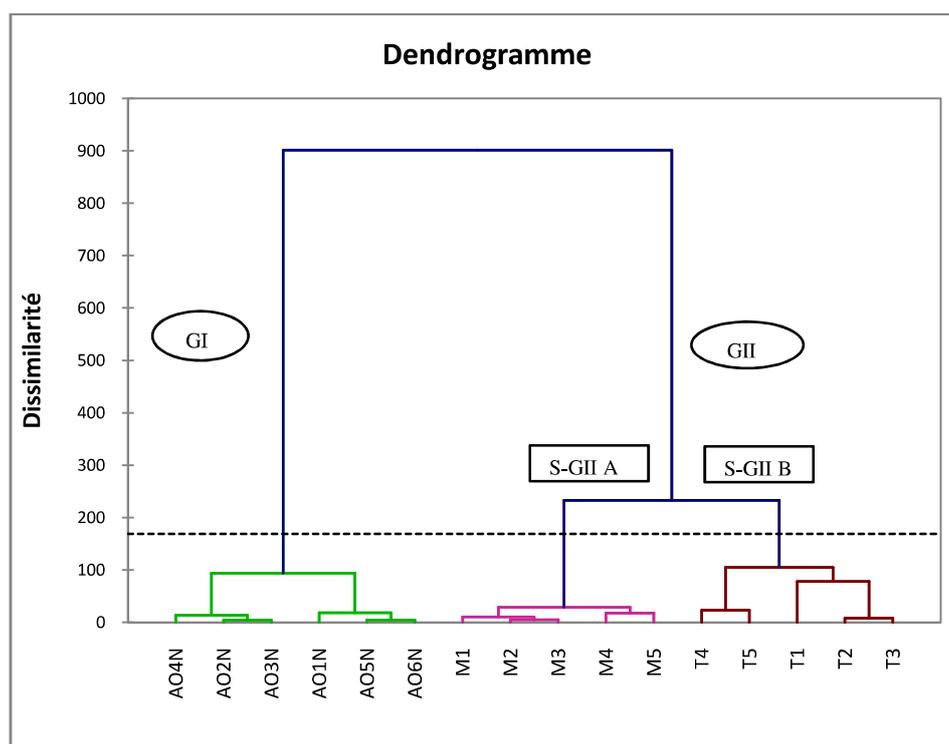
essentielle ont été soumis à trois tests statistiques : une analyse en composantes principales (Figure (8)), une partition utilisant la méthode du *K*-means et une classification ascendante hiérarchique (CAH, dendrogramme : Figure (9)).

Bien que les compositions de ces échantillons soient largement dominées par  $\beta$ -eudesmol (17,6-32,9%), (*E*)-nérolidol (15,8-30,4%) et le linalol (15,3-32,1%), la combinaison des résultats de la classification ascendante hiérarchique et de l'analyse en composantes principales pour laquelle le plan défini par les deux premiers axes décrit 70,39% du total de la variance des populations, permet de définir deux groupes (Tableau (8)) d'huiles essentielles de *W. saharae* :

- Les échantillons du groupe GI appartiennent à la station d'Aïn Ourka (AO1-AO6). Ce groupe se caractérise par des teneurs très similaires en (*E*)-nérolidol (M = 27,8% ; ET = 2,2) et du linalol (M = 27,3% ; ET = 3,3), suivi par le  $\beta$ -eudesmol (M = 19,8% ; ET = 1,7).
- Le groupe II est subdivisé en deux sous-groupes : sous-groupe II A et le sous-groupe II B :
  - Le sous-groupe II A rassemble les 5 échantillons appartenant à la station de Moghrar. Dans ces huiles essentielles, les composés majoritaires à des teneurs très voisines sont le (*E*)-nérolidol (M = 26,4% ; ET = 2,3) et le  $\beta$ -eudesmol (M = 26,8% ; ET = 2,1), suivis de linalol (M = 17,1% ; ET = 1,4).
  - Le sous-groupe II B rassemble les 5 échantillons appartenant à la station de Tiout. Ces échantillons sont caractérisés par une prédominance en  $\beta$ -eudesmol (M = 30,3% ; ET = 2,7), suivi par le linalol (M = 20,9% ; ET = 4,4) et le (*E*)-nérolidol (M = 19,2% ; ET = 2,64).



**Figure (8) : Analyse en composantes principales des compositions chimiques des huiles essentielles de *W. saharae***



Les échantillons sont regroupés en utilisant la technique de Ward avec une mesure de distance Euclidienne

**Figure (9) : Dendrogramme obtenu à partir de l'analyse de Cluster de 16 échantillons d'huile essentielle de *Warionia saharae***

**Tableau (8) : Pourcentages moyens des constituants des huiles essentielles de *W. saharae* dans les groupes GI et GII (S-GII A, S-GII B)**

Composés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	GI	GII	
				S-GII A	S-GII B
<i>p</i> -Cymène	1011	1209	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,4 ± 0,2
1,8-Cinéole	1020	1243	1,2 ± 0,3	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,3
$\gamma$ -Terpinène	1047	1243	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1
<b>Linalol</b>	1081	1544	<b>27,3 ± 3,4</b>	<b>17,1 ± 1,4</b>	<b>20,9 ± 4,4</b>
Terpinèn-4-ol	1161	1596	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,5
$\alpha$ -Terpinéol	1171	1691	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,5	2,6 ± 0,8
Carvotanacétone	1218	1673	1,3 ± 0,2	1,7 ± 0,5	4,2 ± 3,7
Géraniol	1232	1837	1,0 ± 0,2	1,4 ± 1,0	2,8 ± 0,9
<b>(E)- Nérolidol</b>	1546	2037	<b>27,8 ± 2,2</b>	<b>26,4 ± 2,3</b>	<b>19,2 ± 2,6</b>
$\gamma$ -Eudesmol	1620	2167	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,3
<b><math>\beta</math>-Eudesmol</b>	1642	2233	<b>19,9 ± 1,7</b>	<b>26,7 ± 2,1</b>	<b>30,3 ± 2,7</b>
$\alpha$ -Eudesmol	1648	2218	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1

Enfin, les échantillons du sous-groupe II B présentent un type chimique identique à la composition chimique citée par Sellam et *al.* en 2012, qui rapportent que l'huile essentielle de *W. saharae* récoltée à Errachidia (Maroc) contient le  $\beta$ -eudesmol (23,74%) comme composé majoritaire, suivi de (*E*)-nérolidol (17,95%) et de linalol (16,79%) qui présentent des teneurs voisines.

De même, la composition chimique des échantillons du sous-groupe II A se rapproche plus ou moins de celle citée par Znini et *al.* en 2011, qui révèlent une prédominance du  $\beta$ -eudesmol (30,0% à 45,6%), suivi de (*E*)-nérolidol (8,6% à 31,5%) et de linalol (12,5% à 19,3%).

Par contre, le type chimique des échantillons du groupe I caractérisé par des teneurs élevées et très similaires en (*E*)-nérolidol (M = 27,8% ; ET= 2,2) et en linalol (M = 27,3% ; ET=3,3), n'a jamais été citée auparavant. En effet, aucune étude ne rapporte des teneurs élevée en linalol.

## II. *Pulicaria mauritanica*

Parmi les espèces de *Pulicaria* poussant à l'état spontané en Algérie, *Pulicaria mauritanica* Coss. qui croit d'une manière abondante dans la région de Nâama.

L'huile essentielle des parties aériennes de cette plante est d'odeur agréable, de couleur jaunâtre ambrée et d'aspect liquide. Elle a fait l'objet de deux études au sud du Maroc, la première est faite par Gattefossé et Igolen en 1945. Ces auteurs rapportent que la carvotanacétone est le composé majoritaire avec un pourcentage de l'ordre de 81,0%. La deuxième étude est réalisée par Cristofari et *al.* en 2011. L'étude menée par ces auteurs sur l'huile essentielle de cette plante récoltée dans quatre stations différentes au Maroc, révèle également une grande richesse en carvotanacétone (79,99-92,13%), suivie de linalol (0,4-2,1%) et de carvacrol (0,4-2,1%).

L'huile essentielle extraite à partir des racines de *Pulicaria mauritanica* est d'odeur très agréable et de couleur jaunâtre. Pour le meilleur de notre connaissance, aucune étude n'est réalisée concernant la composition chimique et l'activité biologique de cette huile essentielle.

Ainsi, afin de contribuer à la valorisation de cette plante poussant à l'état spontanée en Algérie (région de Nâama), la récolte des parties aériennes de cette plante a été réalisée dans trois lieux différents : Aïn Ouarka (deux stations à 10 km d'intervalle : AO1 et AO2 ; Aïn Sefra (AS). La cueillette a été faite de la manière suivante :

- Avant floraison en octobre 2010 (échantillons : AvF-AO1-N et AvF-AS-N) et en Avril 2011 (échantillon : ApF-AO2-M) ;
- Pleine floraison en novembre 2010 (échantillons : PF-AO1-N1-6, PF-AO2-N1-6, PF-AS-N1-6) et en mai 2011 (échantillons : PF-AO1-M1-6, PF-AO2-M1-6, PF-AS-M1-6) ;
- Fin de floraison, à la fin du mois de novembre (échantillons : FF-AO1N, FF-AS-N) et à la fin du mois de mai (échantillons : FF-AO2-M) ;
- Parallèlement, nous avons extrait l'huile essentielle à partir des feuilles et des fleurs de cette plante en mai 2011 (période de pleine floraison), échantillons : PF-AO1-Fe et PF-AO1-Fl.

La récolte des racines de *Pulicaria mauritanica* a été réalisée en novembre 2011 dans deux stations : Aïn Ouarka et Aïn Sefra (échantillons : AOR1-4 ; échantillons : ASR1-4).

## II.1. Rendements en huiles essentielles des différentes parties de *P. mauritanica*

Les huiles essentielles de cette espèce végétale sont obtenues par hydrodistillation. Les rendements sont calculés par rapport à la matière végétale sèche et représentés dans les tableaux (9), (10) et (11).

**Tableau (9) : Rendements (en %) en huiles essentielles des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* des différentes stations en novembre 2010**

		Rendements (%)				
		Aïn Ouarka (AO1)		Aïn Ouarka (AO2)		Aïn Sefra
Avant Floraison	AvF-AO1-N	0,57		/	AvF-AS-N	0,85
Pleine Floraison	PF-AO1-N1	0,60	PF-AO2-M1	1,0	PF-AS-N1	1,02
	PF-AO1-N2	0,80	PF-AO2-M2	0,70	PF-AS-N2	1,05
	PF-AO1-N3	0,75	PF-AO2-M3	0,70	PF-AS-N3	1,40
	PF-AO1-N4	0,80	PF-AO2-M4	0,70	PF-AS-N4	1,44
	PF-AO1-N5	0,80	PF-AO2-M5	0,90	PF-AS-N5	1,10
	PF-AO1-N6	0,85 %	PF-AO2-M6	0,80	PF-AS-N6	1,01
Moy ± ET		(0,77 ± 0,87)		(10, ± 0,12)		(1,17 ± 0,19)
Après Floraison	FF-AO1-N	0,30		/	FF-AS-N	0,70

PF: Pleine florison, FF: Fin de floraison, N: Novembre, M: Mai.

**Tableau (10) : Rendements (en %) en huiles essentielles des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* des différentes stations en mai 2011**

		Rendements (%)				
		Aïn Ouarka (AO1)		Aïn Ouarka (AO2)		Aïn Sefra
Avant Floraison		/	AvF-AO2-M	0,30		/
Pleine Floraison	PF-AO1-M1	0,50	PF-AO2-M1	0,70	PF-AS-M1	0,50
	PF-AO1-M2	0,40	PF-AO2-M2	0,71	PF-AS-M2	0,50
	PF-AO1-M3	0,50	PF-AO2-M3	0,66	PF-AS-M3	0,40
	PF-AO1-M4	0,50	PF-AO2-M4	0,45	PF-AS-M4	0,42
	PF-AO1-M5	0,45	PF-AO2-M5	0,60	PF-AS-M5	0,50
	PF-AO1-M6	0,40 %	PF-AO2-M6	0,80	PF-AS-M6	0,35
Moy ± ET		(0,45 ± 0,04)		(0,65 ± 0,11)		(0,45 ± 0,06)
Après Floraison		/	FF-AO2-M	0,18		/

*Pulicaria mauritanica* est une plante aromatique caractérisée par deux périodes de floraison précisément en mois de mai et de novembre dans la région de Nâama.

Les rendements en huiles essentielles obtenus en période de novembre (0,77%-1,17%) sont considérablement plus importants que ceux obtenus en mois de mai (0,45-0,65%). Cependant, les rendements les plus élevés sont obtenus à partir de plantes récoltées dans la station d'Aïn Sefra.

Par ailleurs, les rendements en huiles essentielles des plantes collectées en fin de floraison (0,18-0,70%) sont sensiblement plus faibles que ceux obtenus avant floraison (0,30-0,85%).

Par contre, les rendements en huiles essentielles des feuilles et des fleurs sont faibles de l'ordre de 0,30 % et 0,33 % respectivement.

Par comparaison de nos résultats avec les travaux antérieurs, nous avons constaté que la teneur en huiles essentielles de cette même espèce récoltée en mois de mars dans quatre stations différentes au Maroc est de l'ordre de 0,65%, très proche de nos résultats obtenus au mois de mai (Cristofari et al., 2011).

Ainsi, le rendement en huiles essentielles varie suivant diverses conditions : l'environnement, origine géographique et la période de récolte (Svoboda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2001).

**Tableau (11) : Rendements (en %) en huiles essentielles des racines de *Pulicaria mauritanica* des différentes stations en novembre 2011**

Aïn Ouarka				Aïn Sefra			
AOR1	AOR2	AOR3	AOR4	ASR1	ASR2	ASR3	ASR4
0,13	0,13	0,15	0,15	0,20	0,19	0,19	0,17

Selon le tableau (11), les rendements en huiles essentielles des racines de *Pulicaria mauritanica* sont très faibles variant entre 0,13 et 0,20%.

## II.2. Analyse des huiles essentielles de *Pulicaria mauritanica*

### II.2.1. Analyse des huiles essentielles des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica*

Afin de contribuer à la caractérisation de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* poussant à l'état spontané en Algérie (région de Nâama), nous avons procédé, en premier lieu, à une analyse détaillée d'un échantillon d'huile essentielle en appliquant conjointement une technique chromatographique (CPG-Ir) et deux techniques spectroscopiques (CPG/SM et RMN <sup>13</sup>C). Ensuite, pour mettre en évidence l'existence d'un éventuel polymorphisme chimique, 36 échantillons d'huile essentielle de la partie aérienne de *Pulicaria mauritanica* ont été préparés et analysés par : CPG-Ir et RMN <sup>13</sup>C.

Nous avons, par la suite, étudié l'évolution de la composition chimique de cette huile essentielle au cours du cycle de développement de la plante. Parallèlement, nous avons déterminé la composition chimique des huiles essentielles, obtenues à partir des différentes parties de la plante : feuilles et fleurs.

### II.2.1.1. Analyse détaillée de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. mauritanica*

Nous avons procédé à une analyse d'un échantillon en appliquant conjointement une technique chromatographique (CPG-Ir) et deux méthodes spectroscopique (RMN  $^{13}\text{C}$  et CPG/SM). La caractérisation de cette huile essentielle a été réalisée par RMN  $^{13}\text{C}$  sans séparation préalable des constituants. Des spectres des huiles essentielles sont enregistrés, et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celle des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre grâce à un logiciel d'aide à l'identification. L'interrogation de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire, nous a permis d'identifier 5 composés qui représentent un pourcentage de l'ordre de 94,1% (Tableau 12). Les constituants identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$ , sont ensuite repérés sur le chromatogramme par leurs indices de rétention, sur colonnes polaire et apolaire, par comparaison avec ceux des produits de référence et peuvent être ainsi quantifiés. Nous précisons que pour chaque composé tous les signaux des carbones attendus sont observés, à l'exception de certains signaux des carbones quaternaires de composés minoritaires. Il est à noter également que tous les composés identifiés étaient présents dans notre bibliothèque de spectres « Terpènes » constituée au laboratoire, à l'exception de la carvotanacétone dont les valeurs des déplacements chimiques observées sont conformes à celles publiées par Dos Santos et *al.* en 2001. Carvotanacétone (RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , ppm) : 200,71 ; 145,37 ; 135,30 ; 42,06 ; 42,00 ; 32,05 ; 29,89 ; 19,57 ; 19,51 ; 15,68.

Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes oxygénés dont un composé nettement majoritaire, la carvotanacétone qui représente 89,2%. Deux sesquiterpènes oxygénés sont également identifiés, qui représentent 3,9%. Le  $\beta$ -eudesmol est le composé sesquiterpénique majoritaire, avec un pourcentage de l'ordre de 3,2%.

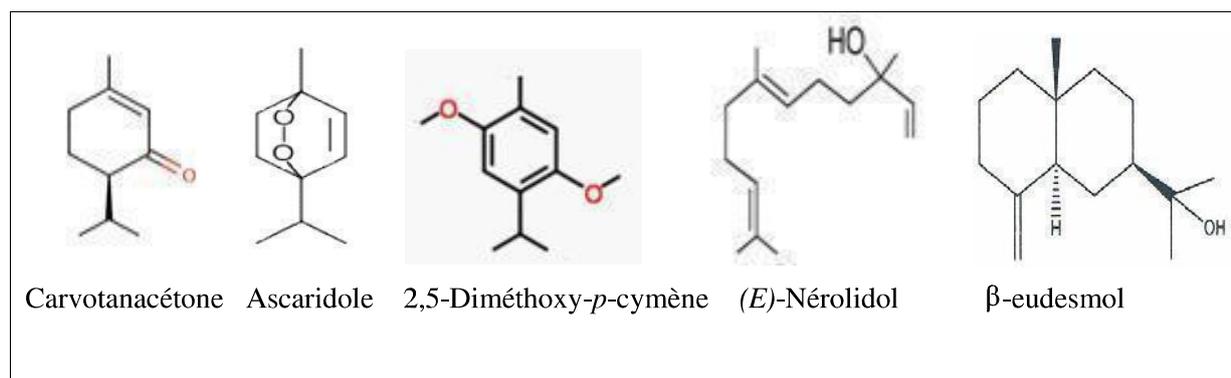
**Tableau 12 : Composés identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$  dans l'huile essentielle de la partie aérienne de *P. mauritanica***

Composés identifiés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	%	RMN	SUP
<b>Carvotanacétone</b>	1225	1680	<b>89,2</b>	<b>10/10</b>	<b>2</b>
Ascaridole	1230	1710	0,5	8/10	1
2,5-Diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1399	1866	0,5	10/12	2
(E)-Nérolidol	1547	2035	0,7	13/15	3
$\beta$ -Eudesmol	1635	2242	<b>3,2</b>	<b>12/15</b>	<b>2</b>
<b>Total (%)</b>			<b>94.1</b>		

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire (BP-1). Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup>: indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20).

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'huile essentielle de *Pulicaria mauritanica* de cet échantillon est reproduit sur la figure présentée en annexe 9, ainsi que la structure de la carvotanacétone composé très majoritaire de cette huile essentielle.

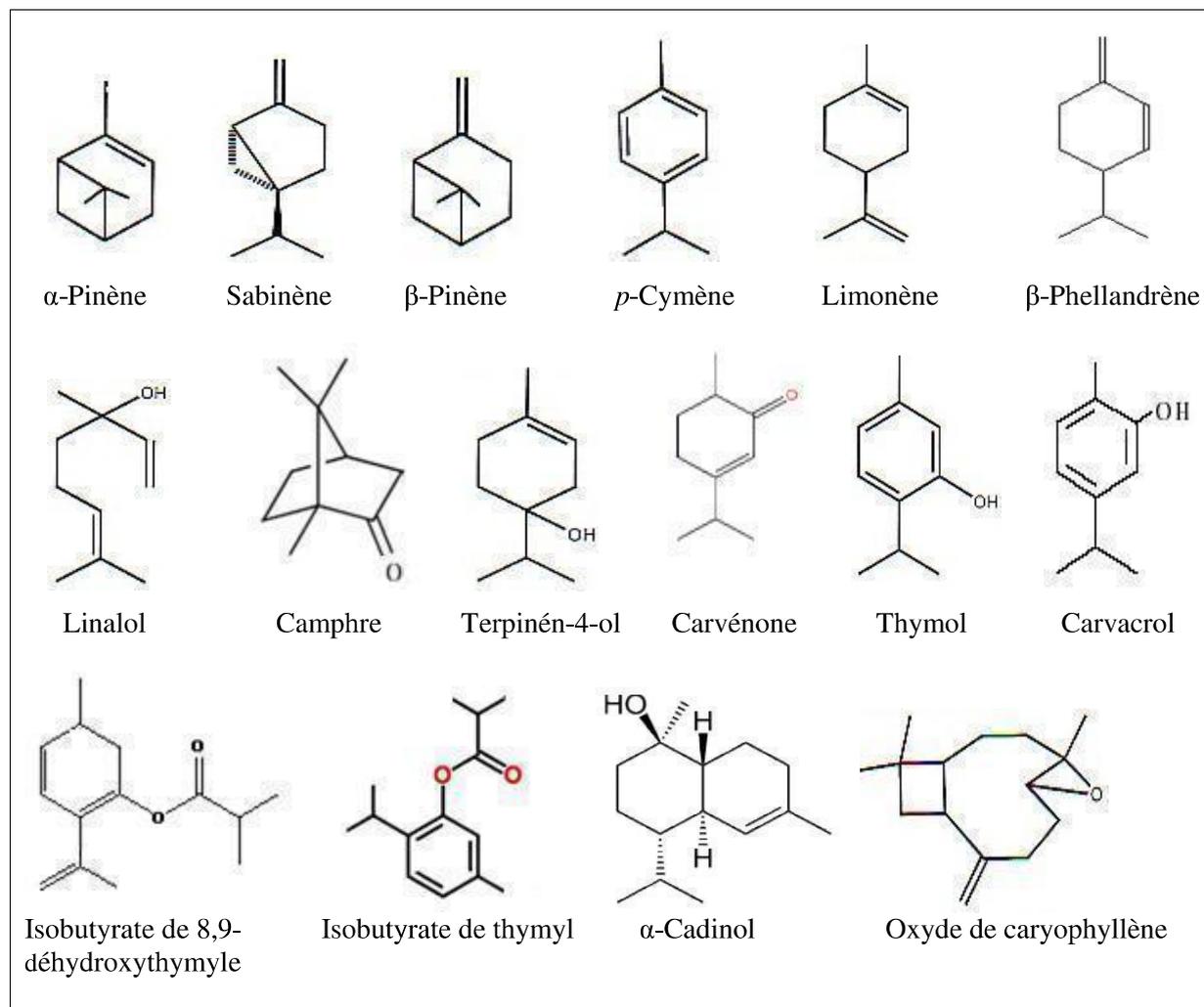
Nous illustrons sur la figure (10) la structure des molécules identifiées lors de l'analyse de cette huile essentielle.



**Figure (10) : Structure des composés identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$  dans l'huile essentielle de *P. mauritanica***

L'application de la CPG/SM, pour l'analyse de cet échantillon, nous a permis d'identifier 16 autres composés minoritaires (Tableau 13) de teneurs inférieures à 0,5% qui ne peuvent pas être identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$ . Une fois identifiés, ces composés sont aisément repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention sur colonnes polaire et apolaire, ce qui permet leur quantification.

Sur la figure (11), nous représentons les structures des composés identifiés par CPG/SM, en analysant cette huile essentielle.



**Figure (11) : Composés identifiés par CPG/SM dans l'huile essentielle de *P. mauritanica***

Quatorze de ces composés sont des monoterpènes dont six de nature oléfinique ( $\alpha$ -pinène, sabinène,  $\beta$ -pinène, *p*-cymène, limonène et  $\beta$ -phellandrène) et le reste de nature oxygéné (camphre, terpinén-4-ol, carvénone, thymol, carvacrol, isobutyrate de 8,9-déhydroxythymyle et isobutyrate de thymyle). Les deux sesquiterpènes identifiés sont de nature oxygénée, soit : l'oxyde de caryophyllène et le  $\alpha$ -cadinol.

En conclusion, nous avons identifiés 21 composés dans l'huile essentielle de *Pulicaria mauritanica* représentant 97,0% de la composition chimique globale (Tableau 13).

**Tableau (13) : Composition chimique de l'huile essentielle d'un échantillon de *P. mauritanica***

Constituants	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	%	mode d'identification
$\alpha$ -Pinène	932	1025	0,3	RI, MS
Sabinène	967	1125	Tr	RI, MS
$\beta$ -Pinène	973	1114	Tr	RI, MS
<i>p</i> -Cymène	1013	1276	0,2	RI, MS
Limonène*	1021	1203	Tr	RI, MS
$\beta$ -Phellandrène*	1021	1211	0,1	RI, MS
Linalol	1084	1543	0,3	RI, MS
Camphre	1121	1515	0,1	RI, MS
Terpinén-4-ol	1162	1598	Tr	RI, MS
Carvotanacétone	1226	1680	<b>89,2</b>	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
Ascaridole	1230	1710	0,5	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
Carvénone	1243	1585	0,4	RI, MS
Thymol	1268	2198	0,3	RI, MS
Carvacrol	1277	2228	0,3	RI, MS
2,5-Diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1399	1866	0,5	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
Isobutyrate de 8,9-déhydroxythymyle	1456	1935	0,2	RI, MS
Isobutyrate de thymyle	1460	1896	0,3	RI, MS
(E)-Nérolidol	1547	2035	0,7	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
Oxyde de caryophyllène	1570	1976	0,4	RI, MS
$\alpha$ -Cadinol	1626	2228	Tr	RI, MS
$\beta$ -Eudesmol	1635	2242	3,2	RI, MS, <sup>13</sup> C NMR
<b>Total (%)</b>			<b>97,0</b>	

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire). ; Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). Tr : trace.

Cette huile essentielle est très riche en monoterpènes oxygénés, soit onze composés qui représentent 92,1%. La carvotanacétone, monoterpènes oxygéné est de loin le composé très majoritaire de l'ordre de 89,2%. Par contre, les monoterpènes oléfiniques sont présents en très faibles teneurs, soit six constituants avec un pourcentage de l'ordre de 0,6%. Cette huile essentielle contient également que des sesquiterpènes oxygénés, présents en quantités appréciables de l'ordre de 4,3%, avec prédominance du  $\beta$ -eudesmol (3,2%).

#### **II.2.1.2. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle de *Pulicaria mauritanica***

Afin de mettre en évidence un éventuel polymorphisme chimique au sein de l'espèce *Pulicaria mauritanica* poussant à l'état spontané en Algérie, nous avons analysé 36 échantillons récoltés en pleine floraison dans trois stations de la région de Nâama : novembre 2010 (échantillons : PF-AO1-N1-6, PF-AO2-N1-6, PF-AS-N1-6) ; mai 2011 (échantillons : PF-AO1-M1-6, PF-AO2-M1-6, PF-AS-M1-6). Tous les échantillons d'huile essentielle ont été analysés par CPG(Ir) et par RMN  $^{13}\text{C}$ . Ainsi, sur l'ensemble des échantillons, nous avons identifié 21 composés représentant (96,7 à 98,4%) de la composition globale (Annexe 2). Nous rapportons dans le tableau (14) les teneurs des quatre constituants majoritaires.

Tableau (14) : Composés majoritaires identifiés dans les 36 échantillons d'huile essentielle de *Pulicaria mauritanica*

	Aïn Ouarka (AO1)						Aïn Ouarka (AO2)						Aïn Sefra AS)					
	PF-AO1-N			PF-AO1-M			PF-AO2-N			PF-AO2-M			PF-AS-N			PF-AS-M		
	Moy±ET (%)	Min. (%)	Max. (%)	Moy±ET (%)	Min. (%)	Max. (%)	Moy±ET (%)	Min. (%)	Max. (%)	Moy±ET (%)	Min. (%)	Max. (%)	Moy±ET (%)	Min. (%)	Max. (%)	Moy±ET (%)	Min. (%)	Max. (%)
Linalol	0,5 ± 0,2	0,2	0,8	0,2 ± 0,1	0,1	0,3	0,2 ± 0,1	0,1	0,4	0,5 ± 0,5	0,1	1,5	0,1 ± 0,1	tr	0,1	0,1 ± 0,0	0,1	0,1
<b>Carvotanacétone</b>	<b>93,4 ± 1,6</b>	<b>91,6</b>	<b>95,0</b>	<b>92,7 ± 2,2</b>	<b>89,2</b>	<b>96,1</b>	<b>94,6 ± 0,4</b>	<b>93,9</b>	<b>95,1</b>	<b>94,2 ± 1,9</b>	<b>90,6</b>	<b>96,1</b>	<b>95,1 ± 0,4</b>	<b>94,7</b>	<b>95,6</b>	<b>95,2 ± 1,1</b>	<b>93,3</b>	<b>96,1</b>
(E)-Nérolidol	0,9 ± 0,6	0,1	1,8	0,3 ± 0,2	Tr	0,7	0,1 ± 0,2	-	0,5	0,2 ± 0,2	Tr	0,6	0,0 ± 0,0	-	Tr	0,0 ± 0,1	Tr	0,0
β-Eudesmol	0,9 ± 0,7	0,1	1,7	1,0 ± 1,2	Tr	3,2	0,2 ± 0,3	-	0,6	0,6 ± 0,8	Tr	2,1	0,0 ± 0,0	-	Tr	0,1 ± 0,1	Tr	0,3

PF: Plein floraison, Moy: Moyenne des six échantillons, ET : écart type, N: novembre, M: mai, Tr: trace (pourcentage (< 0,05%)).

Les échantillons analysés sont qualitativement et quantitativement très proches. L'ensemble de ces huiles essentielles sont caractérisées par la présence majoritaire de monoterpènes oxygénés (91,3-97,5%). En effet, la composition chimique de ces 36 échantillons est fortement dominée par la carvotanacétone (89,2-96,1%). Concernant la teneur en cette cétone, nous avons remarqué aucune différence, voire une très faible différence entre les deux périodes en pleine floraison (mai et novembre). Il en est de même concernant les trois stations d'étude. Par contre, nous avons remarqué une variabilité chimique quantitative particulièrement pour les composés suivants :  $\beta$ -eudesmol (0,0-3,2%), (*E*)-nérolidol (0,0-1,8%) et linalol (tr-0,8%). De plus, il est à noter que les sesquiterpénols :  $\beta$ -eudesmol et (*E*)-nérolidol sont absents, voire présents en très faible quantité dans la station de Aïn Sefra. En conclusion, les trente six échantillons étudiés présentent une composition chimique homogène dominée par la carvotanacétone (89,2-96,1%).

Ainsi nos résultats sont bien en accord avec les travaux réalisés par Cristofari et *al.* en 2011, en particulier, pour les pourcentages en carvotanacétone (89,2-96,1% contre 79,99-92,13%), respectivement. Nous avons constaté également que nos huiles essentielles représentent des pourcentages plus importants en  $\beta$ -eudesmol (0,0-3,2% contre 0,11-0,41%) et des pourcentages plus faibles en d'autres composés, à savoir : le linalol (tr-0,8% contre 0,36-2,10%) ; le carvacrol (tr-0,3% contre 0,41-2,05%) et le 2,5-diméthoxy-*p*-cymène (tr- 0,5% contre 0,15-1,73%). Nos huiles contiennent également des quantités appréciables en (*E*)-nérolidol (0,0-1,8%) qui n'a pas été identifié dans les travaux de Cristofari et *al.* en 2011. Ces auteurs avancent également l'existence d'autres composés en faibles teneurs qui ne sont pas identifiés dans nos échantillons à savoir : isobutyrate d'isobutyle, 1,8-cinéole, (*Z*)-verbénol, bornéol, *p*-cymèn-8-ol, décanal, dihydroédulan, acétone de géranyle, 6-oxo-cyclonérolidol,  $\tau$ -cadinol et (*E*)-phytol. De même, certains constituants, tels que : sabinène, limonène,  $\beta$ -phellandrène, ascaridole et isobutyrate de 8,9-déhydroxythymyle ne sont pas rapportés précédemment.

### II.2.1.3. Composition chimique de l'huile essentielle au cours du cycle de développement de cette espèce végétale

Parallèlement, nous avons déterminé la composition chimique des parties aériennes au cours du cycle de développement de cette plante. Pour cela, nous avons analysé les huiles essentielles de cette espèce végétale récoltée dans deux stations en automne et dans une seule station en printemps :

- Avant floraison en octobre 2010 (échantillons : AvF-AO1-N et AvF-AS-N) et en Avril 2011 (échantillon : ApF-AO2-M) ;
- Fin de floraison, à la fin du mois de novembre (échantillons : FF-AO1N, FF-AS-N) et à la fin du mois de mai (échantillons : FF-AO2-M) ;

Tous les échantillons d'huile essentielle ont été analysés par CPG(Ir) et par RMN <sup>13</sup>C et comparés à la composition chimique des huiles essentielles de cette même plante récoltée en pleine floraison (Tableau 15).

Selon les résultats obtenus, nous remarquons que dans les trois stations et quelle que soit la période de la récolte (mai ou novembre), la composition est qualitativement et quantitativement homogène. La carvotanacétone est toujours le composé très majoritaire.

Par contre, comme précédemment, nous avons constaté dans la station AS (Aïn Sefra) que les deux sesquiterpènes oxygénés : le (*E*)-nérolidol et le β-eudesmol sont absents dans l'huile essentielle de cette espèce végétale récoltée avant la floraison, pendant et à la fin de la floraison.

#### **II.2.1.4. Composition des huiles essentielles obtenues à partir de différentes parties du végétal : fleurs et feuilles**

Nous avons également déterminé la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles et des fleurs de cette plante récoltée dans la station d'Aïn Ourka (AO1) en mai 2011 (période de pleine floraison), échantillons : PF-AO1-Fe et PF-AO1-Fl. Ces huiles essentielles ont été analysées par CPG(Ir) et par RMN <sup>13</sup>C et comparées à la composition chimique des huiles essentielles de cette même plante récoltée en pleine floraison à la même période (Tableau 16).

Nous avons constaté également que la composition chimique des huiles essentielles des feuilles, des fleurs et des parties aériennes en pleine floraison de la même station est homogène. La carvotanacétone, monoterpène oxygéné est également le constituant fortement majoritaire. Par contre, il est à noter que l'huile essentielle des feuilles est plus riche en (*E*)-nérolidol (0,5% contre Tr) et en β-eudesmol (1,7% contre 0,7%) que l'huile essentielle des fleurs.

Tableau 15 : Evolution de la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *P. mauritanica* au cours du cycle de développement

Composés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	Station AO1 (Novembre)			Station AO2 (Mai 11)			Station AS (Novembre)		
			AvF	PF (Moy)	FF	AvF	PF (Moy)	FF	AvF	PF (Moy)	FF
$\alpha$ -Pinène	932	1026	0,1	0,2	Tr	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5	0,2
Sabinène	967	1025	--	--	--	--	--	--	--	--	--
$\beta$ -Pinène	973	1114	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>p</i> -Cymène	1013	1273	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
Limonène*	1021	1203	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,1	0,1	Tr
$\alpha$ -Phellandriène*	1021	1211	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	Tr	0,1	0,1	Tr
<b>Linalol</b>	1084	1544	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
Camphre	1121	1515	0,1	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,1	Tr
Terpinéol 4	1163	1599	0,1	Tr	0,2	Tr	0,1	0,1	--	--	Tr
<b>Carvotancétone</b>	1226	1680	<b>89,8</b>	<b>94,0</b>	<b>91,0</b>	<b>94,3</b>	<b>94,2</b>	<b>94,2</b>	<b>96,8</b>	<b>95,1</b>	<b>95,3</b>
Ascaridole	1230	1710	Tr	0,2	Tr	0,3	0,3	0,3	Tr	0,2	0,6
Carvénone	1243	1583	1,1	0,5	1,1	1,1	0,6	0,6	0,5	0,6	0,3
Thymol	1268	2199	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,2
Carvacrol	1277	2229	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,3	Tr	0,1	0,1
2,5-Diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1399	1866	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	Tr	--	0,2	0,3
Isobutyrate de 8,9-déhydroxythymyle	1456	1935	0,1	0,1	0,2	0,1	Tr	Tr	--	0,1	0,1
Isobutyrate de thymyle	1460	1897	--	0,1	Tr	Tr	0	--	--	0,1	0,2
<b>(E)-Néolidol</b>	1548	2035	<b>1,5</b>	<b>0,9</b>	<b>0,7</b>	<b>Tr</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>--</b>
Oxyde de caryophyllène	1570	1976	0,2	0,2	0,5	0,2	<b>0,3</b>	0,3	0,1	0,2	0,2
$\alpha$ -Cadinol	1626	2176	--	--	--	--	--	Tr	--	--	--
<b><math>\beta</math>-Eudesmol</b>	1635	2242	<b>1,7</b>	<b>0,7</b>	<b>1,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,4</b>	<b>--</b>	<b>--</b>	<b>Tr</b>
<b>Total (%)</b>			<b>95,9</b>	<b>98,3</b>	<b>96,1</b>	<b>97,2</b>	<b>97,7</b>	<b>97,4</b>	<b>98,2</b>	<b>97,8</b>	<b>97,8</b>

Ordre d'éluion et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire). ; Ir<sup>a</sup>, Ir<sup>p</sup> : indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20), Tr : trace ; Moy : Moyennes des six échantillons (Période de pleine floraison) ; AvF : Avant floraison ; FF : Fin de Floraison ; PF : Pleine floraison.

Tableau 16 : Composition Chimique des huiles essentielles des feuilles et des fleurs de *P. mauritanica*

Composés	Station AO1 (Mai)					
	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	Moy	Feuilles	Fleurs	
$\alpha$ -Pinène	932	1026	0,2	0,1	0,1	
Sabinène	967	1025	--	--	--	
$\beta$ -Pinène	973	1114	--	--	--	
<i>p</i> -Cymène	1013	1273	0,2	0,1	0,2	
Limonène*	1021	1203	Tr	Tr	Tr	
$\alpha$ -Phellandrène*	1021	1211	0,1	Tr	Tr	
<b>Linalol</b>	1084	1544	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	
Camphre	1121	1515	Tr	Tr	Tr	
Terpinéol 4	1163	1599	Tr	0,1	0,3	
<b>Carvotanacétone</b>	1226	1680	<b>92,7</b>	<b>93,7</b>	<b>90,1</b>	
Ascaridole	1230	1710	0,5	0,2	0,3	
Carvénone	1243	1583	0,6	0,6	0,4	
Thymol	1268	2199	0,3	0,3	0,3	
Carvacrol	1277	2229	0,3	0,4	0,4	
2,5-Diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1399	1866	0,4	0,1	--	
Isobutyrate de 8,9-déhydroxythymyle	1456	1935	0,2	0,1	Tr	
Isobutyrate de thymyle	1460	1897	0,3	Tr	--	
<b>(E)-Nérolidol</b>	1548	2035	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>Tr</b>	
Oxyde de caryophyllène	1560	1976	0,3	0,4	0,3	
$\alpha$ -Cadinol	1626	2176	Tr	Tr	--	
<b><math>\beta</math>-Eudesmol</b>	1635	2242	<b>1,1</b>	<b>0,7</b>	<b>0,1</b>	
<b>Total (%)</b>			<b>97,8</b>	<b>97,5</b>	<b>92,7</b>	

Ordre d'élution et pourcentages des composés donnés sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire) ; Ir<sup>a</sup>, Ir<sup>p</sup> : indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20) ; Tr : trace ; Moy : Moyennes des six échantillons (Période de pleine floraison).



## II.2.2. Analyse des huiles essentielles des racines de *Pulicaria mauritanica*

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la composition chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica*. Ainsi, afin de contribuer à la caractérisation de l'huile essentielle de *P. mauritanica* poussant spontanément en Algérie (région de Nâama), nous avons procédé en premier lieu, à une analyse de 8 échantillons d'huile essentielle en appliquant conjointement une technique chromatographique (CPG-Ir) et une technique spectroscopique (RMN  $^{13}\text{C}$ ). Ces échantillons sont récoltés en novembre 2011 dans deux stations différentes, à savoir : Aïn Ouarka (échantillons : AOR1-4) et Aïn Sefra (échantillons : ASR1-4). La complexité de la composition chimique de l'huile essentielle a nécessité la combinaison de techniques chromatographiques (fractionnement sur colonne ouverte de silice) avec le CPG/SM et la spectroscopie de RMN du carbone-13 sur l'échantillon de provenance d'Aïn Ouarka récolté en avril 2013. Ces travaux ont été menés en collaboration avec XU Tao, doctorante, sous la direction des Professeurs TOMI Félix et BIGHELLI Ange (université de Corse) en particulier pour les aspects spectroscopiques.

### II.2.2.1. Analyse directe de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica*

La caractérisation de l'huile essentielle d'un échantillon des racines de *P. mauritanica* a été menée par combinaison de trois méthodes d'analyse, une technique chromatographique (CPG-Ir) et deux techniques spectroscopiques (CPG/SM et RMN  $^{13}\text{C}$ ), sans séparation préalable des constituants. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (17). Dans ce chapitre, l'ensemble des constituants identifiés sont numérotés suivant leur ordre d'éluion sur colonne apolaire. Ces mêmes numéros sont présents dans les tableaux 17 et 20 donnant la composition chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* étudiée. L'analyse de cette huile essentielle nous a permis d'identifier quatorze composés représentant 57,4% de la composition chimique globale, avec des indices de rétention (Ir) compris entre 1221 et 1624 sur colonne apolaire. Ces constituants appartiennent à différentes familles de composés, en particulier les dérivés oxygénés du *p*-cymène, à savoir : le 2,5-diméthoxy-*para*-cymène **13** qui est le composé majoritaire de cette huile essentielle avec un pourcentage de l'ordre de (37,2 g/100g), l'isobutyrate de thymyle **20** (3,1 g/100g) et l'isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle **19** (1,7 g/100g). Deux monoterpènes oxygénés sont également identifiés soit, l'isobutyrate de néryle **21** (11,1 g/100g) et l'acétate de bornyle **6** (1,1 g/100g). Le modéphène **11** (0,8 g/100g) et le  $\beta$ -isocomène **14** (1,2 g/100g) sont les deux sesquiterpènes oléfiniques présents en quantités appréciables. Enfin, d'autres composés présents en faibles teneurs, sont identifiés par (CPG-Ir) et CPG/SM, il s'agit de : carvotanacétone **5** (0,1 g/100g), silphin-1-ène

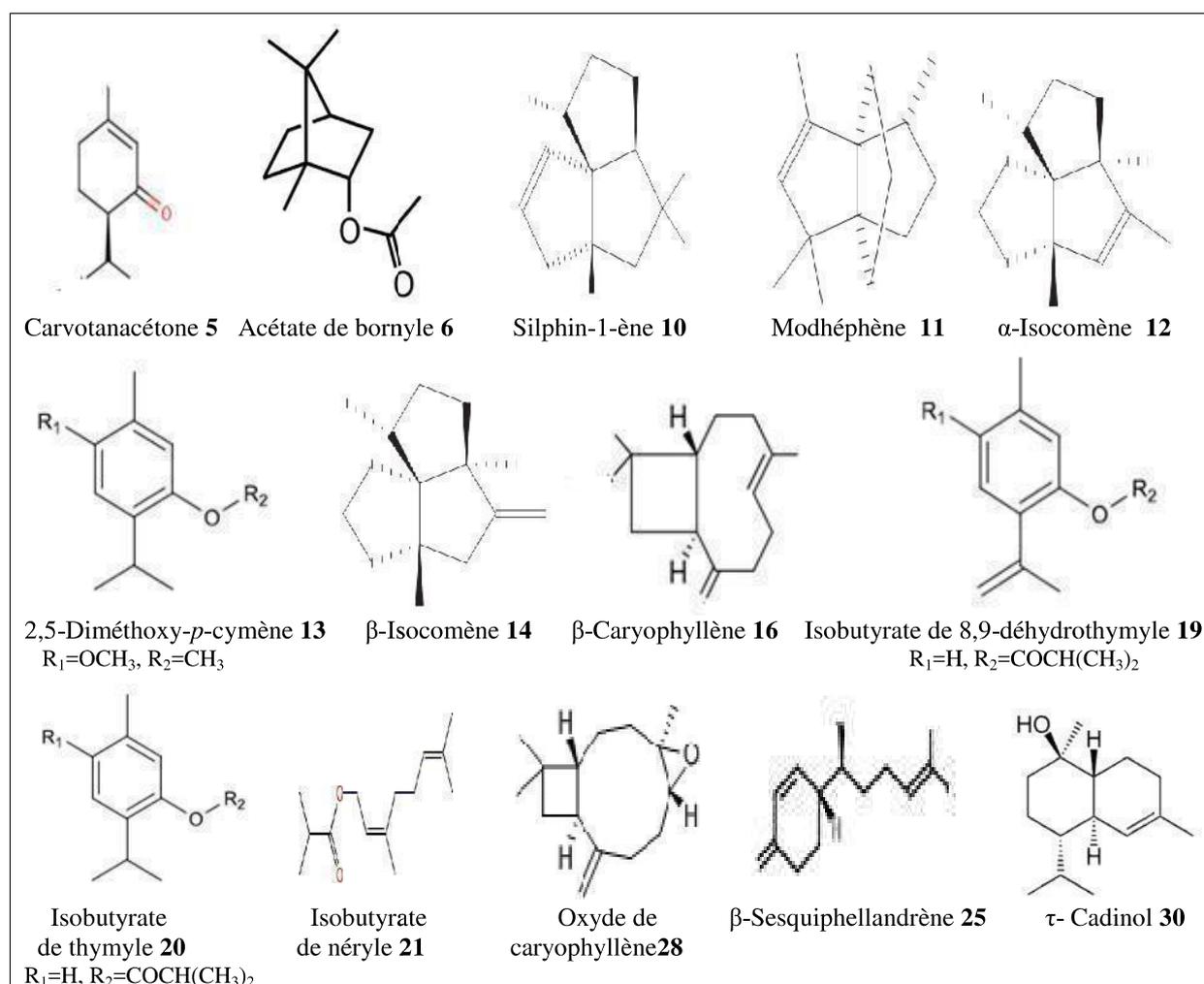
**10** (0,1 g/100g),  $\alpha$ -isocomène **12** (0,4 g/100g), (E)- $\beta$ -caryophyllène **16** (0,2 g/100g),  $\beta$ -sesquiphellandrène **25** (0,2 g/100g), oxyde de caryophyllène **28** (0,2 g/100g) et  $\tau$ -cadinol **30** (tr).

Dans la figure (12), nous donnons, respectivement, les structures des molécules identifiées par RMN  $^{13}\text{C}$  et CPG/SM en analysant l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica*.

**Tableau (17) : Composition chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* après analyse par RMN  $^{13}\text{C}$  et CPG/SM**

N	Composés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	(g/100g)	Mode d'identification
5	Carvotanacétone	1221	1677	0,1	SM
6	Acétate de bornyle	1270	1578	1,1	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
10	Silphin-1-ène	1350	1471	0,1	SM
11	Modhéphène	1382	1522	0,8	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
12	$\alpha$ -Isocomène	1388	1534	0,4	SM
13	<b>2,5-Diméthoxy-<i>p</i>-cymène</b>	1400	1866	<b>37,2</b>	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
14	$\beta$ -Isocomène	1407	1567	1,2	SM
16	(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1419	1471	0,2	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
19	Isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle	1455	1933	1,7	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
20	Isobutyrate de thymyle	1461	1896	3,1	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
21	Isobutyrate de néryle	1471	1776	11,1	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
25	$\beta$ -Sesquiphellandrène	1515	1771	0,2	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
28	Oxyde de caryophyllène	1565	1976	0,2	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
30	$\tau$ -Cadinol	1624	2163	Tr	RMN $^{13}\text{C}$ , SM
	<b>Total</b>			<b>57,4</b>	

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire et sur colonne polaire. Tr : trace.



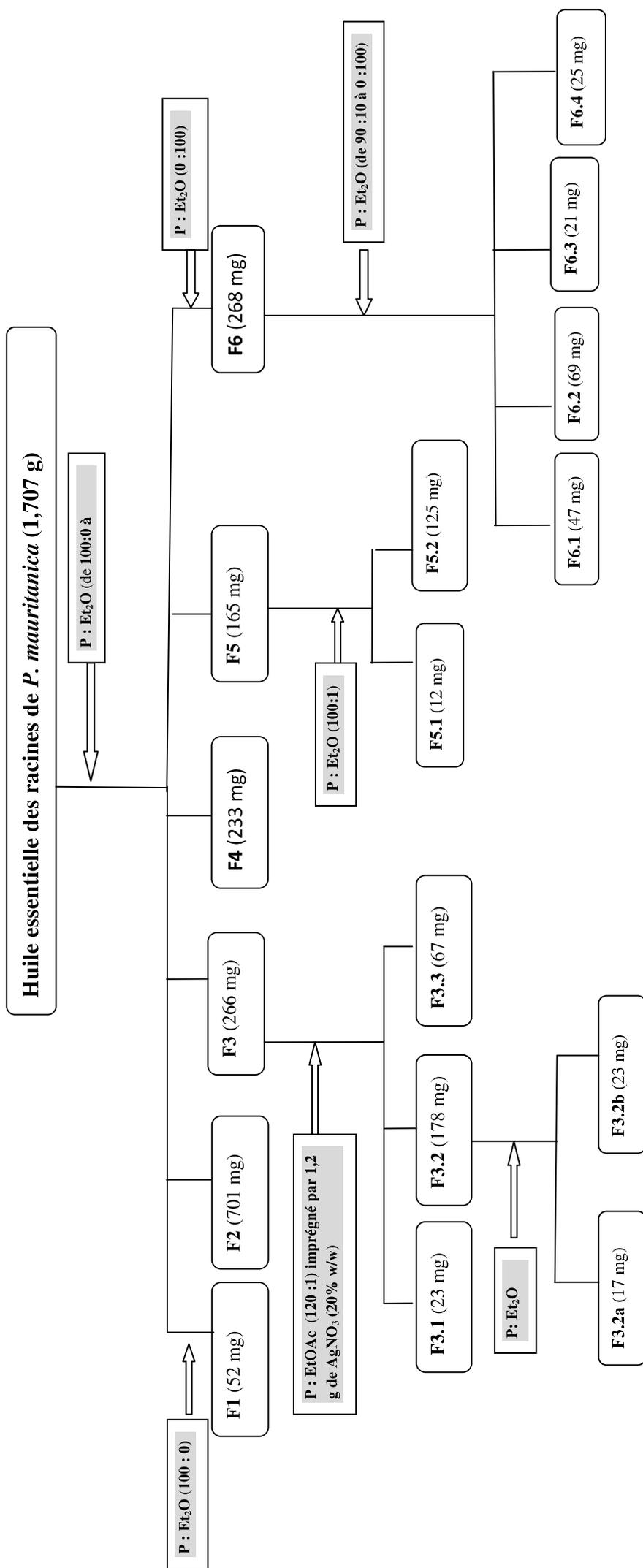
**Figure (12) : Structure des composés identifiés par RMN  $^{13}\text{C}$  et par CPG/SM en analysant l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica***

Nous avons observé que de nombreux composés demeurent non identifiés, par exemple le composé **31** (Ir : 1659/2262) présent à 14,2 g/100g et le composé **29** (Ir : 1582/2005) présent à 4,2 g/100g, molécules absentes au niveau de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire et la bibliothèque « Littérature ».

Au terme de cette analyse directe de l'huile essentielle, seulement 57,4 g/100g de la composition globale a été déterminé. Par conséquent, nous avons réalisé un fractionnement de l'huile essentielle afin d'isoler les composés non identifiés et d'en réaliser son analyse structurale. Ce fractionnement pourrait aussi permettre l'identification d'un plus grand nombre de composés et donc une meilleure caractérisation de l'huile essentielle.

### II.2.2.2. Etude détaillée de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* après fractionnement

Nous avons soumis 1,707 g d'huile essentielle à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice de type « flash » (ICN 200-500  $\mu\text{m}$ , 40 g). Six fractions sont éluées avec un gradient pentane/éther diéthylique de 100:0 à 0:100. La première fraction contient des composés oléfiniques, les fractions F2-F5 contiennent des composés moyennement polaires alors que la fraction F6 est caractérisée par des constituants polaires. La fraction F3 a été de nouveau soumise à un fractionnement par chromatographie sur gel de silice (63-200  $\mu\text{m}$ , 6 g). Trois fractions sont éluées (F3-1 à F3-3) avec un mélange de pentane/acétate d'éthyle (120:1), imprégnée avec 1,2 g d' $\text{AgNO}_3$  (20%, w/w). La fraction F3-2 a été également chromatographiée sur gel de silice (63-200  $\mu\text{m}$ , 4 g) en utilisant un gradient de solvant pentane/éther diéthylique de polarité croissante, donnant deux sous-fractions F3-2a et F3-2b. La fraction F5 a été fractionnée de nouveau avec pentane/éther diéthylique (100:1) sur gel de silice (63-200  $\mu\text{m}$ , 4 g) et a abouti à deux fractions : F5-1 et F5-2. De même, la fraction F6 a été soumise de nouveau à un fractionnement sur gel de silice (63-200  $\mu\text{m}$ , 6 g) avec un gradient pentane/éther diéthylique (90:10 à 0:100), en donnant quatre fractions : F6-1-F6-4. Les différentes étapes de ce fractionnement sont décrites dans la figure (13). Les fractions ainsi obtenues sont analysées par CPG-Ir, par CPG/SM et par RMN  $^{13}\text{C}$ . En outre, la présence des composés minoritaires identifiés précédemment par CPG/SM dans l'huile essentielle, ont été confirmés par RMN  $^{13}\text{C}$  dans les fractions.



**Figure (13) : Schéma du fractionnement de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* par chromatographie « flash » sur gel de silice**

### II.2.2.2.1. Etude de la fraction hydrocarbonées F1

L'analyse par CPG (Ir) et CPG/SM de la fraction hydrocarbonée F1 a permis d'identifier trois composés hydrocarbonés, soit : myrcène **2** (tr), *p*-cymène **3** (tr), (*Z*)- $\beta$ -ocimène **4** (tr) et cinq composés par CPG (Ir), CPG/SM et RMN  $^{13}\text{C}$ , à savoir : camphène **1** (0,6%), 7 $\alpha$ -H-silphiperfol-5-ène **8** (1,6%), (*E*)- $\beta$ -farnésène **17** (3,2%),  $\gamma$ -muurolène **22** (0,8%) et  $\beta$ -bisabolène **24** (0,6%).

### II.2.2.2.2. Etude des fractions oxygénées F2 à F6

L'analyse directe par CPG (Ir) et par CPG/SM des fractions oxygénées a conduit à l'identification de deux monoterpènes oxygénés supplémentaires. Il s'agit de : carvacrol **7** (0,2% dans la fraction F6.3) et l'acétate de néryle **9** (0,2% dans la fraction F2).

La structure d'isobutyrate de carvacryle **23** (0,8% dans la fraction F2) a été suggérée par combinaison de la CPG(Ir) et de la CPG/SM. Il a été confirmé par comparaison des valeurs des déplacements chimiques relevés dans le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  de la fraction F10 avec celles du composé pure obtenu par estérification du carvacrol.

Par consultation de la banque « Littérature », nous avons pu identifié également sept composés supplémentaires, portant le squelette du *p*-cymène avec une ou plusieurs fonctions oxygénés, à savoir : 8,9-déhydro-2,5-diméthoxy-*p*-cymène **15** (1,2% dans la fraction F2), 2-méthylbutyrate de 8,9-déhydrothymyle **26** (0,2% dans la fraction F3), 2-méthylbutyrate de thymyle **27** (0,5% dans la fraction F3), isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle **34** (79,8% dans la fraction F5.3), isobutyrate de 10-(2-méthylbutyryloxy)-8,9-déhydrothymyle **35** (21,0 % dans la fraction F6.3), isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle **36** (81,7% dans la fraction F6) et isobutyrate de 10-(2-méthylbutyloxy)-8,9-époxythymyle **37** (45,1% dans la fraction F6.3).

Nous avons observé dans les fractions F4 et F5 la présence de deux séries de raies de résonance correspondant aux deux constituants absents dans la bibliothèque de spectres « Terpènes » et « Littérature ». Après une série de chromatographie sur colonne ouverte de la silice, nous avons pu les concentrer dans les fractions F4 et F5.1. La structure de ces deux composés a été déduite facilement à partir des spectres RMN du carbone 13 et du proton H. Il s'agit de l'isobutyrate 6-méthoxythymyle **31** (58,3% dans la fraction F5.1) et de l'isobutyrate 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle **32** (13,8% dans la fraction F4).

Le composé **29** (4,1 g/100g dans l'huile essentielle et 21,2% dans la fraction F3) est resté non identifié après analyse par CPG/SM et par RMN  $^{13}\text{C}$  en utilisant toutes les bibliothèques commerciales informatisées disponibles. Une série de fractionnement sur colonne ouverte de cette fraction a permis d'isoler ce produit à 80% dans la fraction F3.2b,

d'indices de rétention 1582 et 2005 respectivement sur colonnes apolaire et polaire, et ainsi l'identifier par une analyse structurale en mettant en œuvre une série complète de séquence de RMN 1D et 2D. Ce composé a été identifié comme étant la **modhéphane-3-one 29**, qui à notre connaissance, n'a jamais été identifié à partir d'une source naturelle.

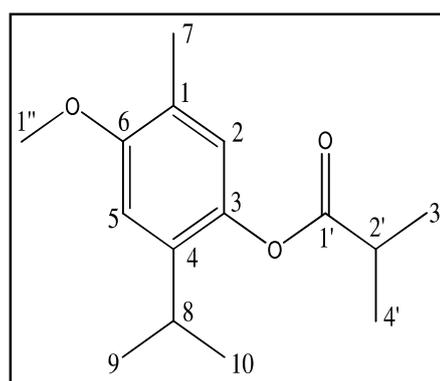
### II.2.2.2.3. Identification des molécules absentes de la bibliothèque de spectres de RMN du $^{13}\text{C}$ du laboratoire et analyse structurale des composés non identifiés

Dans cette partie, nous apportons une attention particulière aux molécules absentes de la bibliothèque « Terpènes » du laboratoire et qui ont été identifiées soit à partir de la bibliothèque « Littérature » soit par une analyse structurale en mettent en œuvre une série complète de séquence de RMN 1D et 2D. Dans le cas d'une identification à partir des données spectrales présentes dans la littérature, nous avons présenté la structure pour chaque molécule, l'attribution des déplacements chimiques de chaque carbone observé dans la fraction dans laquelle la proportion du composé est la plus importante.

#### ➤ Isobutyrate de 6-méthoxythymyle (31)

Le composé **31** est le composant majoritaire dans la sous fraction F5.1 (58,3%). Il a été identifié aisément par comparaison des spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$  avec ceux du méthylcarvacrol et isobutyrate de thymyle. Les déplacements chimiques de ce composé relevés sur les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$  de la fraction F5.1 correspondent parfaitement avec ceux décrits dans la littérature par Zee et *al.* en 1998 (Figure 14).

C	$\delta$ (31)	$\delta$ (Litt.)
1	124,96	125,0
2	124,04	124,0
3	140,9	140,9
4	137,88	137,9
5	107,59	107,7
6	155,61	155,6
7	15,8	15,8
8	27,38	27,4
9	22,95	23,0
10	22,97	23,0
1'	176,18	176,1
2'	34,2	34,2
3'	19,03	19,0
4'	19,03	19,0
1''	55,56	55,6



$\delta$  (Litt.) : déplacements chimiques en ppm décrits dans la littérature (Zee et *al.*, 1998).

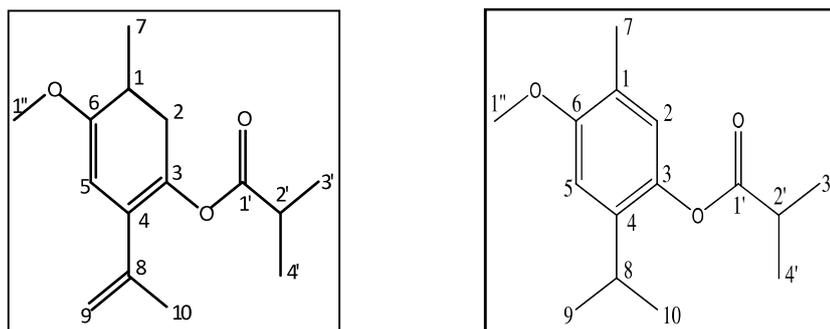
$\delta$  (31) : déplacements chimiques observés en ppm dans la fraction F5.1

**Figure (14) : Structure et déplacements chimiques des carbones de l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle 31**

➤ **Isobutyrate de 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle (32)**

Les déplacements chimiques des carbones de l'isobutyrate 6-méthoxythymyle **31** nous ont servi de référence pour réaliser l'attribution chimique de l'isobutyrate 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle **32** (13.8% dans la fraction F4) (Figure 15).

L'identification de l'isobutyrate de 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle **32** est confirmée par comparaison des spectres de masse des composés **31** et **32** (Annexe 4, Annexe 5).



**Composé 32**

**Composé 31**

C	$\delta$ (31)	$\delta$ (32)
1	<b>124,96</b>	<b>126,56</b>
2	<b>124,04</b>	<b>124,42</b>
3	<b>140,9</b>	<b>140,31</b>
4	<b>137,88</b>	<b>134,25</b>
5	<b>107,59</b>	<b>110,22</b>
6	<b>155,61</b>	<b>155,21</b>
7	<b>15,8</b>	<b>15,9</b>
8	27,38	<b>141,72</b>
9	22,97	<b>115,6</b>
10	22,97	<b>23,56</b>
1'	176,18	<b>175,97</b>
2'	34,2	<b>34,11</b>
3'	19,03	<b>18,92</b>
4'	19,03	<b>18,92</b>
1''	55,56	<b>55,61</b>

$\delta$  (31) : déplacements chimiques de 6-méthoxythymyle isobutyrate **31** observés dans la fraction F5.1.

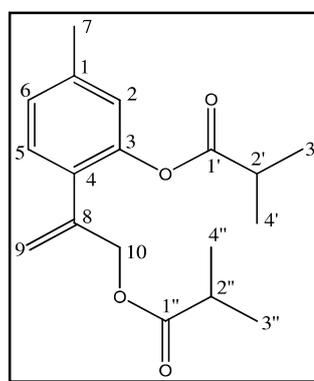
$\delta$  (32) : déplacements chimiques de 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle isobutyrate **32** observés dans F4.

**Figure (15) : Structures et déplacements chimiques des carbones des composés : isobutyrate de 6-méthoxythymyle 31 et isobutyrate de 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle 32**

➤ **Isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle (34) et isobutyrate de 10-(2-méthylbutyryloxy)-8,9-déhydrothymyle (35)**

Nous avons constaté que le composé **34** est majoritaire avec 79,8% dans la sous fraction F5.3 et le composé **35** avec 21,0% dans la sous fraction F6.3. Ceci, nous a permis une attribution des déplacements chimiques. Ainsi, les deux composés ont été identifiés par comparaison avec les déplacements chimiques des carbones décrits dans la littérature par Weremczuk-Jezyna et *al.* en 2011, qui ont identifiés ces composés dans l'huile essentielle des racines d'*Arnica montana* (Figure 16).

C	δ (34)	δ (Litt.)
1	139,1	139,2
2	123,12	123,4
3	147,89	147,8
4	129,47	129,7
5	129,7	129,7
6	126,69	126,7
7	21,04	21,1
8	140,6	140,5
9	116,52	117,2
10	65,84	66,3
1'	176,55*	-
2'	34,12**	-
3'	18,93***	-
4'	18,93***	-
1''	175,51*	-
2''	34,00**	-
3''	18,90***	-
4''	18,90***	-



**Composé 34**

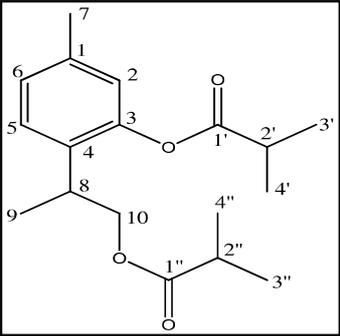
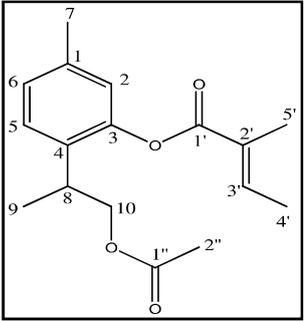
δ (Litt.) : Déplacements chimiques en ppm décrits dans la littérature (Weremczuk-Jezyna et *al.*, 2011).

δ (34) : Déplacements chimiques observés en ppm dans la fraction F5.3.

\*, \*\*, \*\*\* : Déplacements chimiques interchangeables

**Figure (16) : Structure et déplacements chimiques des carbones du composé isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle 34**

Dans le spectre de masse de l'isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle **34** (Annexe 6), les groupements isobutyrate sont caractérisés par les fragments à 43 et à 71 m/z. Une fois le composé **34** identifié, nous employons la même méthode et la même référence (Weremczuk-Jezyna et *al.*, 20011) pour identifier le composé **33** (6,5% dans F5.2) présenté dans la figure (17). Le composé **33** est identifié comme étant l'isobutyrate de 10-isobutyryloxy thymyle. Le spectre de masse de ce composé est reproduit dans l'annexe 7.

	C	$\delta$ (33)	$\delta$ (Litt.)
 <p>Composé 33</p>	1	137,5	139,2
	2	122,9	123,4
	3	148,6	147,8
	4	131,69	129,7
	5	127,14	129,7
	6	126,96	126,7
	7	20,9	21,1
	8	31,88	31,8
	9	17,25	17,2
	10	68,15	66,3
	1'	176,96*	-
	2'	34,32**	-
	3'	19,02***	-
	4'	18,97***	-
 <p>Littérature</p>	1''	175,67*	-
	2''	33,93**	-
	3''	18,93***	-
	4''	18,93***	-

$\delta$  (Litt.) : déplacements chimiques en ppm décrits dans la littérature (Weremczuk-Jezyna et al. (2006).

$\delta$  (33) : déplacements chimiques observés en ppm dans la fraction F5.

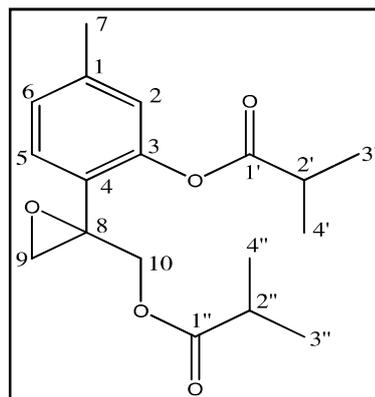
\*, \*\*, \*\*\* : déplacements chimiques interchangeables

**Figure (17) : Structure et déplacements chimiques de l'isobutyrate de 10-isobutyryloxy thymyle (33)**

➤ **Isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle (36) et isobutyrate de 10-(2-méthylbutyloxy)-8,9-époxythymyle (37)**

L'analyse spectrale en RMN  $^{13}\text{C}$  de la fraction F6 montre que plusieurs composés possèdent le motif époxy et deux fonctions ester de thymyle. L'isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle **36** (81,7% dans la fraction F6) et l'isobutyrate de 10-(2-méthylbutyloxy)-8,9-époxythymyle **37** (45,1% dans la fraction F6.3) sont identifiés par comparaison des valeurs des déplacements chimiques des carbones avec celles décrites dans la littérature par Zee et al. en 1998 qui ont identifié ces composés dans l'huile essentielle de *Carpesium divaricatum* (Figure 18 et 19).

C	$\delta$ (36)	$\delta$ (Litt.)
1	139,92	139,8
2	122,97	122,9
3	148,57	148,6
4	125,98	126
5	128,94	128,9
6	126,75	126,6
7	21,14	21
8	56,93	56,8
9	50,7	50,7
10	64,85	64,8
1'	176,43	176,3
2'	34,2	34,1
3'	18,89	18,8
4'	18,89	18,8
1''	175,35	175,2
2''	33,85	33,8



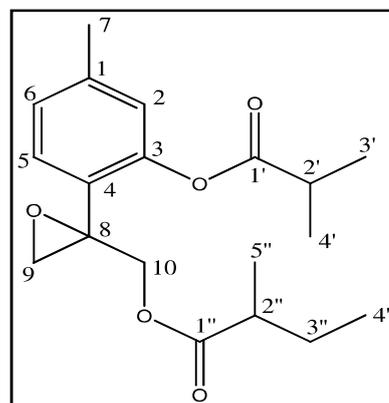
Composé 36

$\delta$  (Litt.) : Déplacements chimiques en ppm décrits dans la littérature (Zee et al., 1998).

$\delta$  (36) : Déplacements chimiques observés en ppm dans la fraction F6

**Figure (18) : Déplacements chimiques de l'isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle (36)**

C	$\delta$ (37)	$\delta$ (Litt.)
1	139,91	139,9
2	122,97	122,9
3	148,61	148,6
4	126,02	126
5	128,81	128,9
6	126,74	126,7
7	21,13	21,1
8	56,93	56,9
9	50,66	50,7
10	64,77	64,8
1'	176,42	176,4
2'	34,22	34,2
3'	19,03	18,9
4'	18,92	18,8
1''	175,32	175,3
2''	40,88	40,8
3''	26,63	26,6
4''	16,47	16,4
5''	11,39	11,4



Composé 37

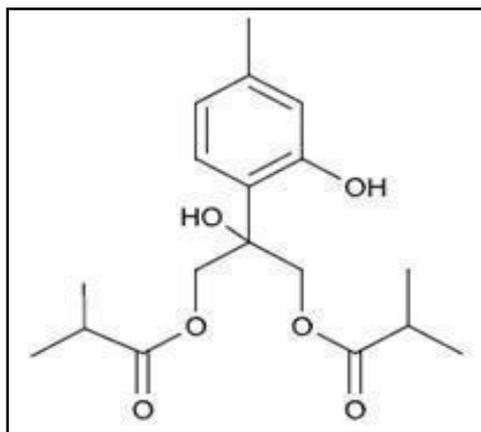
$\delta$  (Litt.) : Déplacements chimiques en ppm décrits dans la littérature (Zee et al., 1998).

$\delta$  (37) : Déplacements chimiques observés en ppm dans la fraction F6.3.

**Figure (19) : Déplacements chimiques de l'isobutyrate de 10-(2-méthylbutyloxy)-8,9-époxythymyle (37)**

➤ **Le composé 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol (38)**

Le 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol **38** (Figure 20) est un composé hautement oxygénée qu'on n'a pas pu détecter par GPC/SM. Cependant, une série de déplacement chimique des carbones sont affecté à ce composé qui est présent à 100% dans la fraction F6.4. Ainsi, par comparaison avec la bibliothèque de spectres « Littérature », nous avons pu l'identifier. Ce composé a été signalé dans les extraits éthanoliques d'*Inula hupehensis* (Zhang et al., 2010).



**Figure (20) : Structure de 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol 38**

➤ **Terpènes oxygénés – élucidation de la structure de modhéphan-3-one (29)**

Le composé **29** (4,1 g/100g dans l'huile essentielle et 21,2% dans la fraction F3) est resté non identifié après analyse par CPG/SM et par RMN  $^{13}\text{C}$  en utilisant toutes les bibliothèques commerciales informatisées disponibles. Une série de fractionnement sur colonne ouverte de cette fraction a permis d'isoler ce produit à 80% dans la sous fraction F3.2b, d'indices de rétention 1582 et 2005 respectivement sur colonnes apolaire et polaire, et ainsi l'identifier par une analyse structurale en mettant en œuvre une série complète de séquence de RMN 1D et 2D. Ce composé a été identifié comme étant la modhéphan-3-one **29**, qui à notre connaissance, n'a jamais été identifié à partir d'une source naturelle.

La formule  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$  a été déduite à l'aide des données de la CPG-MS-TOF, et surtout avec les informations provenant des séquences de RMN 1D et 2D :  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY (corrélation  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) et HSQC (corrélations  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{J}$ ) et HMBC (corrélation  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  ;  $^2\text{J}$ ,  $^3\text{J}$  et  $^4\text{J}$ ) (Tableau 18). Ainsi le composé **29** est identifié comme étant 1S, 2S, 5S, 8S-modhéphan-3-one (Figure 21). Cette étude a été menée en collaboration avec Me XU Tao, doctorante à l'université de Corse.

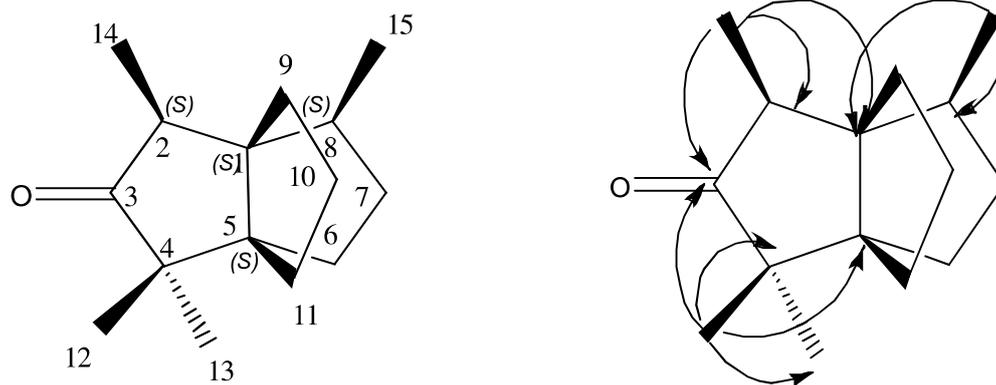


Figure (21) : Structure et conformation de la modhéphan-3-one 29

Tableau (18) : Données spectrales de la modhéphan-3-one

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	DEPT	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	H	Multiplicité (J, Hz)	HMBC	COSY
1	59,7	C					
2	49,7	CH	2,50		q (7,1)	1,3, 9, 14	14
3	224,5	C					
4	49,1	C					
5	61,9	C					
6	25,7	CH <sub>2</sub>	1,48 0,95	a b	m	4	
7	39,1	CH <sub>2</sub>	1,81 1,25	a b		5	6, 8
8	49,6	CH	1,84		m		6,7
9	29,	CH <sub>2</sub>	1,50 1,36	a b	m	2 1, 8	
10	34,5	CH <sub>2</sub>	1,79 1,48	a b	m	5	9,11
11	32,7	CH <sub>2</sub>	1,90 1,40	a b	m	4, 5	10
12	20,6	CH <sub>3</sub>	0,98		large	3, 4, 5, 13	
13	28,1	CH <sub>3</sub>	1,08		large	3, 4, 5, 12	
14	10,6	CH <sub>3</sub>	1,01		d (7,1)	1, 2, 3, 10	2
15	15,1	CH <sub>3</sub>	1,03		d (6,6)	1, 8, 10	8

### II.2.2.3. Bilan de l'analyse des huiles essentielles des racines de *P. mauritanica*

Enfin, l'étude détaillée de l'échantillon de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* a été réalisée en appliquant quatre méthodes d'analyses, deux techniques chromatographiques (CPG-Ir et chromatographie sur colonne ouverte de silice) et deux techniques spectroscopiques (SM et RMN  $^{13}\text{C}$ ). Les composés de toutes les fractions de chromatographie sur colonne de silice, sont repérés sur les chromatogrammes par leurs indices de rétention à l'exception du composé : 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol **38** et par les déplacements chimiques de leurs carbones observés dans les différents spectres de RMN  $^{13}\text{C}$ . La quantification du composé 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol **38** (g/100 g) a été déterminée en tenant compte de la fraction F6.4 par rapport à la quantité globale de l'huile essentielle soumise à la chromatographie sur colonne ouverte de silice car ce composé n'a pas été élué par chromatographie en phase gazeuse. Il est à noter que cette fraction contenait 100% de ce composé en se basant sur l'analyse par RMN  $^{13}\text{C}$ . Ces analyses nous ont permis d'identifier 38 composés qui représentent 90,4 g/100g de la composition globale de l'huile essentielle de *P. mauritanica* (Tableau 20).

Dans un souci de fiabilité et de reproductibilité des résultats, la quantification des constituants par CPG (exprimée en g/100g) a été réalisée en utilisant les facteurs de réponses (FR). Ces derniers, peuvent être assimilés à des facteurs de correction pour quantifier par CPG des constituants préalablement identifiés et améliorer ainsi la justesse des résultats obtenus. Ainsi, en utilisant le nonane comme référence interne, nous avons ainsi calculé les FR (sur colonne apolaire) de **37** composés, mono- et sesquiterpènes (4 momoterpènes oléfiniques : composés de **1-4**), sesquiterpènes oléfiniques (composés : **8, 10-12, 14, 16-18, 22, 24-25**), un alcool et deux dérivés oxygénés (**7, 13, 15**), trois oxydes (**28-30**), une cétone (**5**) et trois acétates (**6, 9, 21**) (Tableau 19). Nous remarquons qu'il y a une corrélation entre les RFs de même famille chimique de composés de référence et celle des composés de notre huile essentielle. On n'a pas pu déterminer le FR du composé 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol **38** qui n'est pas élué par CPG (Ir) et par CPG/SM dans nos conditions d'analyse.

**Tableau (19) : Coefficients de réponse calculés (FRs) pour les composés de référence**

Composés	FR	FRs appliqués aux composants
Camphène, <i>p</i> -cymène	0,93	<b>1-4</b>
(E)- $\beta$ -Caryophyllène	1,07	<b>8, 10-12, 14, 16-18, 22, 24-25</b>
Carvacrol	1,23	<b>7, 13, 15,</b>
Oxyde de caryophyllène	1,32	<b>28-30</b>
Carvone	1,38	<b>5</b>
Acétate de géranyl	1,46	<b>6, 9, 21</b>
Isobutyrate de carvacryle	1,46	<b>19, 20, 23, 26, 27, 31-37</b>
Isobutyrate de 6-méthoxythymyle	1,46	

L'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* a été principalement dominée par les dérivés oxygénés du *p*-cymène, soient : 2,5-diméthoxy-*p*-cymène **13** (37,2 g/100g), isobutyrate de 6-méthoxythymyl **31** (14,2% g/100g) ainsi que l'isobutyrate de néryle **21** (11,1 g/100g), l'isobutyrate de thymyle **20** (3,1 g/100g) et la **modhéphane-3-one 29** (4,1 g/100g). Cette cétone sesquiterpénique tricyclique dont la structure a été élucidée en utilisant la spectroscopie RMN à deux dimensions, est signalée pour la première fois en tant que composé naturel.

La composition chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* présente des similitudes avec celles des huiles essentielles des espèces appartenant à la famille des astéracées, à savoir : *Arnica montana* (Weremczuk-Jezyna et al., 2011), *Doronicum corsicum* (Paolini et al., 2007), *Eupatorium cannabinum* (Paolini et al., 2005), *Eupatorium fortunei* (Tori et al., 2001 ; Wang et al., 2014) et *Telekia speciosa* (Wajs-Bonikowska et al., 2012). Les huiles essentielles de ces espèces végétales sont également caractérisée par la prédominance des dérivés du thymol et du carvacrol associés à des sesquiterpènes portant le tricyclo [3.3.3.0<sup>1-5</sup>] undécane, squelette de la modhéphane.

En effet, Paolini et al. en 2005, ont isolé deux esters dérivés de thymyle dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*. Il s'agit de l'isobutyrate 8,9-déhydrothymyle et de l'isobutyrate de thymyle qui ont été caractérisés par CPG/SM.

En 2006, Weremczuk-Jezyna et al. ont identifié par spectrométrie de masse et par RMN <sup>1</sup>H, cinq dérivés de thymol dans un extrait de racine d'*Eupatorium fortunei*. Ces composés sont : isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymol, isobutyrate de 10-(2-méthyl)-

butyryloxy-8,9-époxythymol, isobutyrate de 10-(3-méthyl)-butyryloxy-8,9-époxythymol, 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxythymol et isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymol.

De même, en 2007, Paolini et *al.*, ont caractérisé par spectrométrie de masse et par RMN du  $^{13}\text{C}$  dans l'huile essentielle de *Doronicum corsicum*, les constituants suivants : isobutyrate de 8,9-déhydrothymyle, 8,9-déhydrothymyle 2-méthylbutyrate et l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle.

En 2012, Wajs-Bonikowska et *al.* ont isolé l'isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymol dans les huiles essentielles de *Telekia speciosa* par spectrométrie de masse et par RMN  $^{13}\text{C}$ .

Enfin, plus récemment, Wang et *al.* en 2014 ont identifié par IR, par SM et par RMN 1D et 2D, cinq dérivés de thymol. Il s'agit du : 9-angéloyloxythymol, 8-hydroxy-9-angéloyloxythymol, 9-acétoxythymol, 9-O-angéloyl-8,10-déhydrothymol et 9-hydroxythymol.

Tableau (20) : Composés identifiés dans l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica*

N°	Composés <sup>a</sup>	Ir <sup>b</sup>	Ir <sup>c</sup>	Ir <sup>d</sup>	FR	%	g/100g	Identification
1	Camphène	950	943	1072	0,93	0,1	0,1	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
2	Myrcène	987	980	1160	0,93	Tr	Tr	IR, SM
3	<i>p</i> -Cymène	1015	1012	1273	0,93	Tr	Tr	IR, SM
4	( <i>Z</i> )-β-Ocimène	1029	1023	1230	0,93	Tr	Tr	IR, SM
5	Carvotanacétone	1220	1221	1677	1,38	0,1	0,1	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
6	Acétate de bornyle	1270	1270	1578	1,46	1,1	1,1	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
7	Carvacrol	1278	1275	2204	1,23	Tr	Tr	IR, SM
8	7α-H-Silphiperfol-5-ène	1329	1328	1425	1,07	0,1	0,1	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
9	Acétate de néryle	1342	1347	1725	1,45	0,3	0,2	IR, SM
10	Silphin-1-ène	1350	1350	1471	1,07	0,1	0,1	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
11	Modhéphène	1383	1382	1522	1,07	1,1	0,8	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
12	α-Isocomène	1389	1388	1534	1,07	0,6	0,4	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
13	<b>2,5-Diméthoxy-<i>p</i>-cymène</b>	1399	1400	1866	1,23	<b>43,2</b>	<b>37,2</b>	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
14	β-Isocomène	1411	1407	1567	1,07	1,5	1,2	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
15	8,9-Déhydro-2,5-diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1420	1416	1960	1,23	0,2	0,2	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
16	( <i>E</i> )-β-Caryophyllène	1421	1419	1471	1,07	0,2	0,2	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
17	( <i>E</i> )-β-Farnesène	1446	1450	1583	1,07	0,2	0,2	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
18	α-Humulène	1455	1452	1668	1,07	Tr	Tr	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
19	Isobutyrate de 8,9-déhydrothymyl	1458	1455	1933	1,46	1,7	1,7	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
20	<b>Isobutyrate de thymyle</b>	1462	1461	1896	1,46	<b>3,1</b>	<b>3,1</b>	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
21	<b>Isobutyrate de néryle</b>	1468	1471	1776	1,46	<b>11,4</b>	<b>11,1</b>	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
22	γ-Murolène	1474	1477	1684	1,07	Tr	Tr	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
23	Isobutyrate de carvacyle	1489	1487	1935	1,46	0,3	0,4	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
24	β-Bisabolène	1503	1507	1719	1,07	Tr	Tr	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
25	β-Sesquiphellandrène	1516	1515	1771	1,07	0,2	0,2	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
26	8,9-Déhydrothymyl 2-méthylbutyrate	1548	1550	2003	1,46	Tr	Tr	IR, SM
27	Thymyle 2-méthylbutyrate	1551	1551	1807	1,46	Tr	Tr	IR, SM
28	Oxyde de caryophyllène	1578	1565	1976	1,32	0,2	0,2	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C

29	<b>Modhéphane-3-one</b>	---	1582	2005	1,32	<b>4,4</b>	<b>4,1</b>	TOF-SM, <sup>1</sup> D, <sup>2</sup> D RMN
30	τ-Cadinol	1633	1624	2163	1,32	Tr	Tr	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
31	<b>Isobutyrate de 6-méthoxythymyle</b>	1658	1659	2262	1,46	<b>13,9</b>	<b>14,2</b>	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
32	Isobutyrate de 6-méthoxy-8,9-Déhydro-thymyle	1676	1666	2259	1,46	2,3	2,4	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
33	Isobutyrate de 10-isobutyryloxy thymyle	1891	1880	2479	1,46	2,6	2,6	IR, SM
34	<b>Isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle</b>	1891	1883	2519	1,46	<b>4,7</b>	<b>4,8</b>	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
35	Isobutyrate de 10-(2-méthylbutyryloxy)-8,9-déhydrothymyle	1970	1967	2601	1,46	0,3	0,4	IR, SM, RMN <sup>13</sup> C
36	Isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle	---	1986	2759	1,46	0,8	0,8	IR, RMN <sup>13</sup> C
37	Isobutyrate de 10-(2-méthylbutyryloxy)-8,9-époxythymyle	---	2056	---	1,46	1,0	1,0	IR, RMN <sup>13</sup> C
38	8-Hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol <sup>e</sup>	---	---	---	---	nd	1,5 <sup>c</sup>	<sup>1</sup> H, RMN <sup>13</sup> C
<b>Total</b>								
Monoterpènes oléfiniques								
Monoterpènes oxygénés								
Dérivés de thymyle et de carvacyle								
Sesquiterpènes oléfiniques								
Sesquiterpènes oxygénés								
<b>90,4</b>								
0,1								
12,5								
70,3								
3,2								
4,3								

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire, <sup>a</sup> : pourcentages mesurés sur colonne apolaire, FR: facteur de réponse. Tr : Traces < 0,05%, nd : non déterminé. Ir<sup>c</sup> et Ir<sup>d</sup> : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20), Ir<sup>b</sup> : indices de rétention prises de la littérature (Terpenoids Library Website, [http://massfinder.com/wiki/Terpenoids\\_Library](http://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library)).

RMN <sup>13</sup>C : composés identifiés par RMN du C13 dans l'huile essentielle et au moins dans une des fractions, RMN <sup>13</sup>C : composés identifiés par RMN du C13 dans une des fractions.

Les indices de rétention des composés 29 et du 36 au 38 ne sont pas cités dans la littérature

#### II.2.2.4. Etude de la variabilité chimique de l'huile essentielle des racines de *Pulicaria mauritanica*

Dans le but de mettre en évidence une homogénéité ou une éventuelle variabilité chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica*. Nous avons analysé 8 échantillons récoltés en pleine floraison dans deux stations d'Aïn Ourka et Aïn Sefra (région de Nâama). Le matériel végétal a été récolté durant le mois de novembre 2011 (échantillons AO1-AO4 et AS1-AS4).

La composition chimique des huiles essentielles a été déterminée par CPG (Ir) et par RMN du <sup>13</sup>C. Nous avons opéré par comparaison des indices de rétention sur deux colonnes de différentes polarités avec ceux relevés dans les études détaillées précédentes. Au total, 37 composés représentant (83,9% à 88,1%) de la composition globale de l'huile essentielle ont été identifiés (Annexe 3). Dans le tableau 21, nous avons rapportés les 11 constituants majoritaires, représentant 74,7% à 80,7% de la composition globale de l'huile essentielle. Les échantillons analysés sont qualitativement et quantitativement très proches. L'ensemble de ces huiles sont caractérisées par la dominance des dérivés oxygénés du *p*-cymène : le 2,5-diméthoxy-*p*-cymène (28,0-37,9%), l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle (8,2-12,1%) ainsi que l'isobutyrate de néryle (4,6-6,3%), l'isobutyrate de thymyle (2,2-4,6%) et la modhéphane-3-one (4,4-5,8%). On n'a pas pu déterminer le composé 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol (38) dans nos échantillons parce qu'il n'est pas suffisamment volatil et par conséquent il n'est pas élué par CPG (Ir) dans nos conditions d'analyse.

**Tableau (21) : Composés majoritaires identifiés dans les 8 échantillons d'huile essentielle des racines de *P. mauritanica***

Composés <sup>c</sup>	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	Moy ± EC	Min (%)	Max (%)
2,5-Diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1400	1866	31,6 ± 2,97	28,0	37,9
Isobutyrate de 8,9-Déhydrothymyle	1455	1933	1,9 ± 0,56	1,4	2,8
Isobutyrate de thymyle	1461	1896	3,1 ± 1,01	2,2	4,6
Isobutyrate de néryle	1471	1776	5,5 ± 0,55	4,6	6,3
Modhéphane-3-one	1582	2005	4,9 ± 0,51	4,4	5,8
Isobutyrate de 6-méthoxythymyle	1659	2262	10,3 ± 1,34	8,2	12,1
Isobutyrate de 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle	1666	2259	2,3 ± 0,39	1,6	2,7
Isobutyrate de 10-isobutyryloxy thymyle	1880	2479	2,8 ± 0,38	2,2	3,3
Isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle	1883	2519	5,4 ± 0,97	4,4	6,8
Isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-époxythymyle	1986	2759	8,3 ± 1,59	5,3	10,6
Isobutyrate de 10-(2-méthylbutyloxy)-8,9-époxythymyle	2056	----	1,5 ± 0,21	1,0	1,7

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire. Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). <sup>c</sup> % : pourcentages mesurés sur colonne apolaire. Moy : moyenne. EC : écart type. Min : minimum. Max : maximum.

### III. Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des différentes plantes :

Dans cette partie, nous avons testé les huiles essentielles des deux espèces végétales vis-à-vis de souches cités précédemment, en appliquant deux méthodes.

Dans un premier temps, nous avons testé l'activité de ces huiles essentielles par une méthode rapide (la méthode de diffusion sur disque) et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) en appliquant la méthode de contact direct en milieu gélosé.

#### III.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

L'aromatogramme est une méthode qualitative, simple, appliquée en routine à toute bactérie considérée comme pathogène. Cette méthode permet d'explorer un grand nombre d'huiles essentielles vis-à-vis de chaque souche.

Nous rapportons dans le tableau 22 les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles des parties aériennes et des racines de *Pulicaria mauritanica*, et des parties aériennes de *Warionia saharae* relatives aux souches microbiennes de référence. Ainsi, nous avons testé l'antibiorésistance de chaque souche bactérienne vis-à-vis de deux antibiotiques l'ampicilline et l'oxacilline et la levure vis-à-vis de la nystatine.

**Tableau (22) : Aromatogramme : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) des huiles essentielles relatives aux différentes souches**

Souches microbiennes	Antifongique	Antibiotiques		Huile essentielle (15µl/disque)		
	Nystatine (30µg/disque)	Ampicilline (10µg/disque)	Oxacilline (1µg/disque)	Pulicaria PA	Pulicaria R	Warionia PA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	11,0 ± 0,4	13,5 ± 0,5	10,0 ± 0,7
<i>Escherichia coli</i>	-	15,0 ± 1,0	6,0 ± 0,0	10,0 ± 0,6	11,0 ± 0,5	10,0 ± 1,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	14,7 ± 0,6	13,5 ± 0,5	12,0 ± 0,5
<i>Proteus mirabilis</i>	-	26,0 ± 5,6	15,0 ± 4,2	18,7 ± 2,3	8,5 ± 0,5	10,0 ± 0,0
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	25,0 ± 1,0	6,0 ± 0,0	11,0 ± 1,0	10,5 ± 1,0	11,0 ± 1,2
<i>Citobacter freundii</i>	-	35,0 ± 7,7	17,0 ± 4,2	24,3 ± 2,1	11,0 ± 0,5	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0	22,7 ± 1,5	6,0 ± 0,0	9,0 ± 0,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	27,5 ± 0,7	16,3 ± 1,2	18,0 ± 0,5	11,0 ± 1,0	13,2 ± 1,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	20,0 ± 1,0	6,0 ± 0,0	11,0 ± 0,4	8,3 ± 0,6	11,2 ± 1,3
<i>Lysteria monocytogenes</i>	-	30,0 ± 0,5	15,0 ± 1,4	14,3 ± 0,6	11,5 ± 0,5	12,0 ± 1,2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	30,0 ± 7,7	17,0 ± 4,2	17,0 ± 2,6	10,5 ± 0,5	11,0 ± 0,6
<i>Candida albicans</i>	18,7 ± 1,10	-	-	20,3 ± 1,5	12,3 ± 0,6	12,5 ± 0,5

**Légende :** PA : Partie aérienne, R : Racine, - : Non testé.

Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'une huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 15 mm (Rossi, 2003).

Ainsi, l'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* agit de façon active sur la plupart des bactéries testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, d'*E. coli*, de *Salmonella typhimurium* et d'*Enterococcus faecalis* qui sont particulièrement très résistantes. Les bactéries reconnues comme les moins sensibles aux effets des huiles essentielles restent néanmoins les bactéries à Gram négative, à savoir : *P. aeruginosa* (Dorman et Deans, 2000).

On remarque que l'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* est très efficace contre *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *L. monocytogenes*, *C. freundii*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. pneumoniae* et *E. cloacae* avec des diamètres d'inhibition variant entre 14,3 mm et 24,3 mm.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des racines de *Pulicaria mauritanica* est très faible vis-à-vis de la majorité des souches à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*, pour lesquelles, on remarque une activité modérée. Cette faible activité est du probablement à la composition chimique de l'huile essentielle des racines dont les composés majoritaires sont : 2,5-diméthoxy-*p*-cymène (31,8%) et les dérivés oxygénés du *p*-cymène qui représentent 50% de la composition. Ces substances possèdent une activité antibactérienne modérée selon Zhao et al. en 2009.

Par contre, l'huile essentielle de *W. saharae* révèle une faible activité vis-à-vis de la majorité des souches testées, avec des diamètres des zones d'inhibition variant entre 9,0 et 13,2 mm. On remarque également que la souche *Enterobacter cloacae* est très résistante à cette huile (9,0 mm). Ces résultats sont en accord avec ceux de Sellam et al. en 2012 qui rapportent des CMI's variant entre 5-20 mg/ml. En revanche, elles diffèrent de celles d'Amezouar et al. (2012) qui ont rapporté des valeurs de CMI's de 0,031 à 0,25 µg/ml pour *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

### **III.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI's) par la méthode de contact direct en milieu gélosé :**

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles par la méthode de contact direct en milieu gélosé. Pour cela, nous avons sélectionné seulement l'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* qui possède une forte capacité antimicrobienne, pour lesquelles nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI's) (Tableau 23).

**Tableau (23) : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en huile essentielle de la partie aérienne de *P. mauritanica* relatives aux souches microbiennes testées**

Souches bactériennes	Huile essentielle (CMI : µl/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,00
<i>Proteus mirabilis</i>	4,00
<i>Citobacter freundii</i>	2,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	3,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,00
<i>Lysteria monocytogenes</i>	4,00
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4,00
<i>Candida albicans</i>	2,00

Teixeira et al. en 2005, avancent que toute huile essentielle qui présente des CMI inférieurs à 2000 µg/ml, est considérée avoir un potentiel antimicrobien.

Ainsi, l'activité de cette huile essentielle sur l'ensemble des souches microbiennes est modérée. Les souches microbiennes les plus sensibles sont : *Citrobacter freundii* et *Candida albicans*, inhibées à des CMI faibles de l'ordre de 2 µl/ml. Par contre, les bactéries les plus résistantes sont : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Lysteria monocytogenes* et *Streptococcus pneumoniae*.

On remarque que l'appartenance des souches bactériennes à Gram (+) ou à Gram (-) n'influe pas sur leur sensibilité. En effet, la susceptibilité des bactéries est indépendante du Gram (Ouattara et al., 1997 ; Dorman et Deans, 2000).

L'importante activité de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* vis-à-vis de ces souches microbiennes est due probablement au composé majoritaire la carvotanacétone, monoterpène oxygéné présent à un pourcentage de l'ordre de 89,2%. Généralement la bio-activité des monoterpènes tels que les cétones, les alcools et les aldéhydes a été démontré contre des agents pathogènes (Pauli, 2001). Par contre, il est à noter que l'activité antibactérienne d'une huile essentielle est attribuée principalement à son composé majoritaire, l'effet synergique ou antagoniste de chacun de ses constituants présents en faible teneur est également considéré (Pasteur et al., 1995 ; Chang et al., 2001 ; Daferera et al., 2003).

Nos résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Awadh et al. en 2012. En effet, il a été démontré que l'huile essentielle de *Pulicaria undulata* dont le constituant majoritaire est la carvotanacétone avec un pourcentage de l'ordre de 91,4 %, présente une activité modérée, voire

faible contre les bactéries suivantes : *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* et *Candida albicans*. Les CMI's obtenues varient entre 3,12-6,25 µL/mL.

### III.3. Détermination de l'activité antifongique des huiles essentielles

La méthode utilisée pour l'activité antifongique est la technique de contact direct en milieu gélosé (Chang et al., 2001). Les huiles essentielles sont additionnées au milieu PDA, les résultats sont reportés dans le tableau 24.

**Tableau (24) : Activité antifongique des huiles essentielles de *P. mauritanica* et *W. saharae***

Souches	CMI's (µg/ml)	Huile essentielle (µl/ml)	
	Nystatine	<i>P. mauritanica</i> PA	<i>W. saharae</i> PA
<i>Alternaria alternata</i>	6,0	2,0	4,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	> 7,5	2,5	8,0
<i>Aspergillus flavus</i>	6,0	3,0	8,0
<i>Cladosporium herbarum</i>	5,0	2,0	5,0

L'huile essentielle des parties aériennes de *P. mauritanica* est la plus active sur les moisissures. En effet, toutes les souches fongiques sont inhibées à des concentrations minimales variant entre 2 et 3 µl/ml. Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Znini et al. en 2013b. Ces auteurs ont testé l'activité antifongique de l'huile essentielle de *P. mauritanica* vis-à-vis de trois souches phytopathogènes, à savoir : *Alternaria sp.*, *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer*. Ils ont obtenus des CMI's de l'ordre de 2 µl/ml pour *Alternaria sp.* et *Penicillium expansum* par la méthode de contact direct. Par contre, l'inhibition totale de la croissance du mycélium par la méthode de microatmosphère a été obtenue à des CMI's de 2 µl par disque pour *Alternaria sp.* et 4 µl par disque pour *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer*.

Par contre, l'huile essentielle de *W. saharae* possède une très faible activité antifongique. En effet, les valeurs des CMI's varient entre 4 à 8 µl/ml. Par comparaison avec les travaux antérieurs, nos résultats sont en accord avec ceux de Sellam et al. en 2012, qui ont rapporté des valeurs de CMI's de l'ordre de 2,5 et 5 mg/ml pour *Candida albicans* et *Penicillium sp.*, respectivement. Il en est de même pour les travaux de Znini et al. en 2013b, qui ont obtenus des CMI's supérieures à 2 µl/ml pour *Alternaria sp.*, *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer*.

Enfin, il est à noter que ces huiles essentielles avaient des effets fongistatiques aux CMI obtenues.

# **CONCLUSION**

La flore Algérienne est riche en plantes aromatiques et médicinales et bon nombre d'entre elles sont des espèces endémiques pouvant être en tant que source de produit à forte valeur ajoutée.

Les huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation de matériel végétal, trouvent de nombreuses applications dans des secteurs très variés et se présentent sous forme de mélanges complexes. Cette complexité réside à la fois dans le fait que les constituants possèdent des structures construites à partir de la même entité mais conduisant paradoxalement à une grande diversité de squelettes. La détermination de la composition chimique, la mise en évidence d'une éventuelle activité biologique constituent des étapes nécessaires pour la valorisation et donc la commercialisation dans les meilleures conditions possibles.

Deux stratégies sont actuellement privilégiées pour l'analyse chimique des huiles essentielles :

- La première se base sur le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG) qui individualise les constituants du mélange et une technique spectroscopique (la SM ou l'IRTF ou éventuellement la RMN), qui permet d'identifier les constituants par comparaison avec les données spectrales de produit de référence contenues dans une bibliothèque des spectres ;

- La deuxième démarche s'apparente à celle employée lors de l'analyse structurale d'une nouvelle molécule puisqu'elle consiste à purifier, par des techniques chromatographiques, les constituants du mélange complexe avant de les identifier par comparaison de leurs caractéristiques spectrales, avec celles de produits de référence.

Parallèlement, le laboratoire de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'université de Corse a mis au point et développé une technique d'analyse des mélanges complexes, basée sur l'utilisation de la RMN  $^{13}\text{C}$  comme outil d'identification des constituants, et éventuellement leur quantification, sans séparation préalable ou avec un fractionnement réduit au minimum. Un logiciel informatique, conçu et développé au laboratoire, permet de comparer les déplacements chimiques du spectre du mélange avec ceux de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres construites au laboratoire ou avec les données de la littérature.

Ainsi, nous avons contribué à la mise en valeur de deux espèces végétales, poussant à l'état spontané dans la région de Nâama (ouest de l'Algérie), et très utilisées en médecine traditionnelle par la population locale : *Warionia saharae* Benth. & Hook. et *Pulicaria mauritanica* Coss., en déterminant la composition chimique et le pouvoir antimicrobien de leurs huiles essentielles.

L'espèce *P. mauritanica* est plus riche en huile essentielle en comparaison avec *W. saharae* dont les rendements varient entre 0,20 - 0,57%. Cependant, les teneurs en huiles essentielles de *P. mauritanica* obtenues en période de novembre (0,77%-1,17%) sont considérablement plus importants que ceux obtenus en mois de mai (0,45-0,65%). Par ailleurs, les rendements en huiles

essentielles des plantes collectées en fin de floraison (0,18-0,70%) sont sensiblement plus faibles que ceux obtenus avant floraison (0,30-0,85%). Par contre, les rendements en huiles essentielles des feuilles et des fleurs sont faibles de l'ordre de 0,30 % et 0,33 % respectivement. De même, les rendements en huiles essentielles des racines de *Pulicaria mauritanica* sont très faibles variant entre 0,13 et 0,20%.

L'étude détaillée de l'huile essentielle de *Warionia saharae* Benth. & Hook., par combinaison de trois méthodes d'analyse, une technique chromatographique (CPG-Ir) et deux techniques spectroscopiques (CPG/SM et RMN  $^{13}\text{C}$ ), nous a permis d'identifier 43 composés qui représentent 89,2% de la composition globale de l'huile essentielle. Elle est dominée par les sesquiterpènes oxygénés (53,6%), suivis par les monoterpènes oxygénés (27,7%). Les composés majoritaires sont (*E*)-nérolidol (25,7%),  $\beta$ -eudesmol (25,0%) et linalol (17,1%). Ensuite, nous avons étudié la variabilité de la composition chimique de 16 échantillons provenant de trois stations de la région de Nâama. L'analyse en Composante Principale (ACP) des résultats ont permis d'obtenir une description statistique de notre échantillonnage. La représentation graphique des échantillons suggère une répartition en deux groupes. Les échantillons du groupe GI se caractérisent par des teneurs très similaires en (*E*)-nérolidol et en linalol, suivi par le  $\beta$ -eudesmol. Le groupe GII est subdivisé en deux sous-groupes : le sous-groupe II A et le sous-groupe II B. Dans le sous-groupe II A, les composés majoritaires à des teneurs très voisines sont le (*E*)-nérolidol et le  $\beta$ -eudesmol, suivi de linalol. Les échantillons du sous-groupe II B sont caractérisés par une prédominance en  $\beta$ -eudesmol, suivi par le linalol et le (*E*)-nérolidol. Il est à noter que le type chimique des échantillons du groupe I n'a jamais été cité auparavant. En effet, aucune étude ne rapporte des teneurs élevées en linalol.

La caractérisation des huiles essentielles des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* Coss., a permis l'identification de 21 composés représentant un pourcentage de 97,0% de la composition globale de ces huiles essentielles. Elle est très riche en monoterpènes oxygénés, soit 11 composés qui représentent 92,1%. La carvotanacétone, monoterpène oxygéné est de loin le composé très majoritaire de l'ordre de 89,2%. Afin de mettre en évidence un éventuel polymorphisme chimique au sein de l'espèce *Pulicaria mauritanica* poussant à l'état spontané en Algérie, nous avons analysé 36 échantillons récoltés en pleine floraison dans trois stations de la région de Nâama pendant les deux cycles de développement. Les 36 échantillons analysés sont qualitativement et quantitativement très proche, l'ensemble de ces huiles sont caractérisées par la présence majoritaire de monoterpènes oxygénés (92,7-97,1%). En effet, la composition chimique de ces 36 échantillons est fortement dominée par la carvotanacétone (89,2-96,1%). Par contre, nous avons remarqué une

variabilité chimique quantitative particulièrement pour les composés suivants :  $\beta$ -eudesmol (0,0-3,2%), (*E*)-nérolidol (0,0-1,8%) et linalol (tr-0,8%). De plus, il est à noter que les sesquiterpénols :  $\beta$ -eudesmol et (*E*)-nérolidol sont absents, voire présents en très faible quantité dans la station de Aïn Sefra.

Nous avons également déterminé la composition chimique des parties aériennes au cours des deux cycles de développement de cette plante. Nous avons constaté que pour les trois stations et quelle que soit la période de la récolte (mai ou novembre), la composition est qualitativement et quantitativement homogène. La carvotanacétone est toujours le composé très majoritaire. De même, la composition chimique des huiles essentielles des feuilles, des fleurs et des parties aériennes en pleine floraison est homogène. La carvotanacétone, monoterpène oxygéné est également le constituant fortement majoritaire. Par contre, il est à noter que l'huile essentielle des feuilles est plus riche en (*E*)-nérolidol (0,5% contre Tr) et en  $\beta$ -eudesmol (1,7% contre 0,7%) que l'huile essentielle des fleurs.

L'ensemble de ces constatations nous amène à conclure que l'espèce *Pulicaria mauritanica*, récoltée dans la région de Nâama, est susceptible d'avoir un intérêt industriel du fait de sa présence en quantité appréciable dans la région, sa richesse en huile essentielle (rendement varie entre 0,77%-1,17%) et de la stabilité de la composition chimique qui font de cette plante une véritable source de carvotanacétone.

Parallèlement, nous avons déterminé la composition chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica*, en appliquant quatre méthodes d'analyse, deux techniques chromatographiques (CPG-Ir et chromatographie sur colonne ouverte de silice) et deux techniques spectroscopiques (SM et RMN  $^{13}\text{C}$ ). Ces analyses nous ont permis d'identifier 38 composés qui représentent 90,4 g/100g de la composition globale de l'huile essentielle de *P. mauritanica*. L'huile essentielle des racines de cette plante a été principalement dominée par les dérivés oxygénés du *p*-cymène, soient : le 2,5-diméthoxy-*p*-cymène (37,2 g/100g), l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle (14,2% g/100g) ainsi que l'isobutyrate de néryle (11,1 g/100g), l'isobutyrate de thymyle (3,1 g/100g) et la **modhéphan-3-one** (4,1 g/100g). Cette cétone sesquiterpénique tricyclique dont la structure a été élucidée en utilisant la spectroscopie RMN à deux dimensions, est signalée pour la première fois en tant que composé naturel. L'étude de la composition chimique de 8 échantillons d'huiles essentielles extraites des racines de *Pulicaria mauritanica* récoltées dans deux stations différentes, révèle une composition qualitativement homogène. Au total, 37 composés représentant (83,9% à 88,1%) de la composition globale de l'huile essentielle ont été identifiés. L'ensemble de ces huiles sont caractérisées par la dominance des dérivés oxygénés du *p*-cymène : le 2,5-diméthoxy-*p*-cymène (28,0-37,9%), l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle (8,2-12,1%) ainsi que

l'isobutyrate de néryle (4,6-6,3%), l'isobutyrate de thymyle (2,2-4,6%) et la modhéphan-3-one (4,4-5,8%).

Après la caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles de ces espèces végétales, nous avons étudié le pouvoir antimicrobien de ces produits naturels vis-à-vis de souches de référence.

Dans un premier temps, nous avons testé l'activité de ces huiles essentielles par une méthode rapide, celle de diffusion sur disque et dans l'affirmation, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) en appliquant la méthode de contact direct en milieu gélosé. Nous avons constaté que l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pulicaria mauritanica* est nettement plus active que celles de ses racines et de *Warionia saharae*, et ceci vis-à-vis de la majorité des souches microbiennes testées, à l'exception de : *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Enterococcus faecalis* qui se sont révélés particulièrement très résistants.

Ensuite, nous avons étudié le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* qui s'est montré la plus active, en définissant le paramètre : CMI.

Ainsi, l'activité de cette huile essentielle sur l'ensemble des souches microbiennes est modérée. Les microorganismes les plus sensibles sont : *Citrobacter freundii* et *Candida albicans* qui sont inhibées à des CMIs faibles de l'ordre de 2 µl/ml. Par contre, les bactéries les plus résistantes sont : *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Lysteria monocytogenes* et *Streptococcus pneumoniae*, inhibées à des CMIs de 4 µl/ml.

La méthode utilisée pour l'activité antifongique est la technique de contact direct en milieu gélosé. L'huile essentielle des parties aériennes de *P. mauritanica* est également la plus active sur les moisissures. En effet, toutes les souches fongiques sont inhibées à des concentrations minimales inhibitrices variant entre 2 et 3 µl/ml.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- ✓ Poursuivre l'étude phytochimique des espèces *Warionia saharae* et *Pulicaria mauritanica* afin d'isoler d'autres métabolites secondaires ;
- ✓ Etudier d'autres activités biologiques de ces métabolites ;
- ✓ Réaliser l'étude *in vivo* et les études relation structure-activité des molécules actives.

**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adams RP. 1989.** Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, *Academic Press*, Inc.: San Diego.
- Adams RP. 2001.** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography /Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.
- Adio AM, König WA. 2005.** Sesquiterpene constituents from the essential oil of the liverwort *Plagiochila asplenioides*. *Phytochem.*, 66: 599-609.
- Adio AM, Paul C, Kloth P, König WA. 2004.** Sesquiterpenes of the liverwort *Scapania undulata*. *Phytochem.*, 65: 199-206.
- Ahmad VU, Jassbi AR. 1999.** Analysis of the essential oil of *Echinophora sibthorpiana* guss. by means of GC, GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR techniques. *J. Essent. Oil Res.*, 11: 107-108.
- Albert K, Dachtler M, Glaser E, Händel H, Lacker T, Schlotterberck G, Strohschein S, Tseng LH, Braumanu U. 1999.** On-line coupling of separation techniques to NMR, *HRC. J. High Resol. Chromatogr.*, 22: 135-143.
- Alekshun MN, Levy SB. 2007.** Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell.*, 128: 1037-1050.
- Aleman LB. 1989.** Exceptional Resolution and New Signals Detected in the <sup>13</sup>C NMR Spectra of Alkanes, *Magn. Res. Chem.*, 27: 1065-1073.
- Al-Yahya MA, El-Sayed AM, Mossa JS, Kozlowski JF, Antoun MD, Ferin M, Baird WM, Cassady JM. 1988.** Potential cancer chemopreventive and cytotoxic agents from *Pulicaria crispa*. *Journal of Natural Products*, 51 (3): 621-624.
- Amezouar F, Badri W, Hsaine M, Bourhim N, Fougrach H. 2012.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of leaves essential oil and ethanolic extract of Moroccan *Warionia saharae* Benth. & Coss. *J. Applied Pharm. Sci.*, 2: 212-217.
- Andrade Fabio DP, Santos LC, Datchler M, Albert K, Vilegas W. 2002.** Use of on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy for the rapid investigation of flavonoids from *Sorocea bomplandii*. *J. Chromatogr. A.*, 953: 287-291.
- Anton R et Witchl M (1999).** Plantes thérapeutiques : traditions pratiques officinales, sciences et thérapeutique, 3<sup>ème</sup> édition, Ed. Française, Strasbourg.
- Audissou JA. 1999.** *Warionia saharae*. *British Cactus and Succulent Journal*, 17: 124-126.
- Awadh NA, Julich WD, Kusnick C, Lindequist U. 2001.** Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *J. of Ethnopharmacology*, 74: 173-179.
- Bahman N, Gholam RA, Parivash G. 2002.** Antimicrobial activity of *Pulicaria dysenterica*. Iranian. *Journal of Pharmaceutical Research*, 1: 31-32.

- Baldovini N, Tomi F, Casanova J. 2001.** Identification and Quantitative Determination NMR of Furanodiene, a Heat-sensitive Compound, in Essential Oils by  $^{13}\text{C}$ -NMR. *Phytochem. Anal.*, 12: 58-63.
- Barel S, Segal R, Yashphe J. 1991.** The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *J. Ethnopharmacol*, 33: 187-191.
- Bekhechi C, Atik Bekkara F, Consiglio D, Bighelli A, Tomi F. 2012.** Chemical variability of the essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, 9 (12): 2742–2753.
- Belboukhari N, Cheriti A, Bombarda E, Gaydou E. 2008.** Essential Oil Composition of the endemic medicinal plant *W. saharae* Benth. and Coss. *J. PhytoChem. & BioSub. J.*, 2: 3.
- Bellakhdar J, Baayaoui A, Kazdari A, Marechal J. 1986.** Herboristes et médecine traditionnelle à Tissint, oasis présaharien du sud Marocain (province de Tata). *Al Biruniya*, 3: 7-50.
- Bianchini A, Tomi F, Richomme P, Bernardini A-F, Casanova J. 2004.** Eudesm-5-en-11-ol from *Helichrysum italicum* essential oil. *Magn. Reson. Chem.*, 42: 983-984.
- Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini, Mondello L, d'Acampora Zellner B, Costa R, Rubiolo P. 2008.** Quantitative analysis of essential oils: a complexe task. *Flavour Fragr. J.*, 23 : 382-391.
- Bielicka-Daszkiewicz K, D'bicka M, Voelkel A. 2004.** Comparison of three derivatization ways in the separation of phenol and hydroquinone from water samples. *J. Chromatogr A.*, 1052: 233-236.
- Bighelli A, Casanova J. 2009.** Analytical Methods for Cymbopogon Oils, in *Essential Oil- Bearing Grasses, The genus Cymbopogon*. Taylor and Francis: London.
- Bilia AR, Flamini G, Taglioli V, Morelli I, Vincieri FF. 2002.** GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chem.*, 76: 307-310.
- Boti JB, Koukoua G, N'Guessan TY, Muselli A, Bernardini AF, Casanova J. 2005.** Composition of leaf, stem bark and root bark oils from *Isolona cooperi* investigated by GC/RI, GC/MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Phytochem. Anal.*, 16: 357-363.
- Bourrel C, Dargent R, Vilrem G, Gaset A. 1995.** Analyse chimique et propriétés fongistatiques de quelques huiles essentielles en milieu liquide. Effet sur la morphogénèse hyphale. *Rivista italiana*, 17: 31-42.
- Boyle W. 1955.** Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfurmer. Essent. Oil Rev.*, 66: 25-28.
- Bradesi P, Tomi F, Terriaga I, Casanova J. 1994.** Identification of Dihydrocarvéol Stereoisomers and their Acetates using Carbon-13 NMR Spectroscopy. *Spectrosc. Lett.*, 27: 921-933.
- Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF. 2003.** Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22: 465-478.

- Bruins AP. 1979.** Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Anal. Chem.*, 51: 967-972.
- Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition, *Tec et Doc.*, Lavoisier, Paris, pp 915.
- Buchanan BB, Grissem W, Jones RL. 2000.** Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*: Rockville, MA, p 1367.
- Burt S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA. 2003.** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol*, 87: 215-220.
- Carée P. 1953.** Précis de technologie et de chimie industrielle. T3. *Ed. Ballière JB.* et fils.
- Cavaleiro C. 2001.** Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal. Thèse de Doctorat, Université de Coimbra, Portugal.
- Cavalli JF, Tomi F, Bernardini A-F, Casanova J. 2004.** Dihydroagarofurans: the fourth isomer isolated from *Cedrelopsis grevei* bark oil. *Magn. Reson. Chem.*, 42: 709-711.
- Chang ST, Chen PF, Chang SC. 2001.** Antimicrobial activity of leaf essential oil and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacology*, 77: 123-127.
- Chericoni S, Flamini G, Campeol E, Cioni PL, Morelli I. 2004.** GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochem. Syst. Ecol.*, 32: 423-429.
- Cicchetti E, Merle P, Chaintreau A. 2008.** Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database. *Flavour and Fragrance Journal*, 23 (6): 450-459.
- Claridge TDW. 1999.** High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, *Tetrahedron Organic Chemistry Series* volume 19, *Elsevier*, Oxford.
- Coleman III WM, Gordon BM, Lawrence BM. 1989.** Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII. *Appl. Spectrosc* 43: 298-304.
- Constantin E, 1996.** Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec et Doc, Paris. pp 1-14.
- Corticchiato M, Casanova J. 1992.** Analyse des mélanges complexes par RMN du Carbone-13 : application aux huiles essentielles. *Analisis Magazine*, 20: 51-58.
- Corticchiato M, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. 1998.** Composition and intraspecific variability of essential oil from *Thymus herba-barona* Lois. *Biochem. Syst. Ecol.*, 26: 915-932.
- Cosentino S, Palma F. 1999.** *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oil. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 130-135.

- Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. 2005.** The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 26: 166-174.
- Costa R, d'Acampora Zellner BML, Crupi, MR, Fina De, Valentino MR, Dugo P, Dugo G, Mondello L. 2008.** GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarhonianthus camphoratus* L. *Flavour Fragr J.*, 23: 40-48.
- Cowan MM. 1999.** Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology Reviews*, 12 : 564-582.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.*, 88: 170-175.
- Cremin P, Donnelly DMX, Wolfender JL, Hostettmann K. 1995.** Liquid Chromatographic-Thermospray Mass Spectrometric Analysis of Sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota: Basidiomycotina) species. *J. Chromatogr. A.*, 710: 273-285.
- Cristofari G, Znini M, Majidi L, Bouyanzer A, Al-Deyab SS, Paolini J, Hammouti B, Costa J. 2011.** Chemical Composition and Anti-Corrosive Activity of *Pulicaria mauritanica* essential oil against the corrosion of mild steel in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6: 6699 – 6717.
- Da Cunha A., Adzet T. 1995.** Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochem.*, 38: 391-396.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2003.** The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis Cinera*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* Crop protection 22: 39-44.
- Decouzon M, Geribaldi S, Rouillard M, Stural JM. 1990.** A New Look at the Spectroscopic properties of Dihydrocarveol Stereoisomers. *Flavour. Fragr. J.*, 5: 147-152.
- De-Eknamkul W, Potduang B. 2003.** Biosynthesis of beta-sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry*, 62(3): 389-398.
- Delort E, Jacquier A. 2009.** Novel terpenyl esters from Australian finger lime (*Citrus australasica*) peel extract. *Flavour Fragr. J.*, 24: 3, 123-132.
- Derome AE. 1987.** Modern NMR Techniques for Chemistry Research. Volume 6 Pergamon Press, Oxford.
- Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic, Zizic S, Kukic J. 2007.** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, 109: 458-463.
- Dorman HJD. 1999.** Phytochemistry and bioactive properties of plant volatile oils: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. *Phd thesis*, University of Strathclyde, Glasgow.
- Dorman HJD, Deans SG. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308-316.

- Dos Santos, Zanatto RB, Brocksom PR, Brocksom U. 2001.** A short synthesis of the monoterpenes (-)-6 $\alpha$ -hydroxycarvotanacetone and (-)-6 $\beta$ -hydroxycarvotanacetone from (R)-(-)-carvone. *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 303-305.
- Dugo P, Mondello L, Dugo L., Stancanelli R, Dugo G. 2000.** LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24: 147-154.
- Dung NX, Cu LD, Khien PV, Muselli A, Casanova J., Bartel A, Leclercq PA. 1998.** Volatile Constituents of the stem and leaf oils of *Eupatorium coelestidum* L. from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.*, 10: 478-482.
- El Abed N, Harzallah-Skhiri F, Boughalleb N. 2010.** Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Pulicaria arabica* (L.) Coss. from Tunisia. *Agricultural Segment*, 1 (2) AGS/1530.
- El-Kamali HH, Yousif MO, Ahmed OI, Sabir SS. 2009.** Phytochemical Analysis of the Essential Oil from Aerial parts of *Pulicaria undulata* (L.) Kostel from Sudan. *Ethnobotanical Leaflets*, 13: 467-471.
- El-Rhaffari L, Zaid A, 2002.** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, pp 293-318.
- Essaqui A, Elamrani A, Cayuela J, Benaïssa M. 2007.** Composition of essential oil of *Warionia saharae* from Morocco. *J. of essential oil Bearing* , 10: 10-14.
- Ezoubeiri A, Gadhi CA., Fdil N, Benharref A, Jana M, Vanhaelen, M. 2005.** Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 467-471.
- Falconer SB, Brown ED. 2009.** New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Curr. Opinion Microbiol.*, 12: 497-504.
- Ferreira MJP, Costantin MB, Sartorelli P, Rodrigues GV, Limberger R, Henriques AT, Kato MJ, Emerenciano VP. 2001.** Computer-Aided Method for Identification of Components in Essential Oils by <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 447: 125-134.
- Fisher K, Phillips C. 2009.** *In vitro* inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *Br. J. Biomed. Sci.*, 66: 180-185.
- Formáček V, Kubeczka KH. 1982.** Quantitative analyse ätherischer öle Mittels <sup>13</sup>C-NMR spektroskopie in aetherische öle, Kubeczka K.H. Ed. *Thieme, Stuttgart*, pp 42-53.
- Formáček V, Kubeczka KH 1982a.** Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. Wiley: Chichester.
- Formáček V, Kubeczka KH. 1982b.** <sup>13</sup>C NMR analysis of essential oils, in aromatic plants: Basic and applied aspects. Margaris N, Koedam A, Vokou D, Ed, Martinus Nijhoff Publishers: La Haye, pp 177-181.

- Francisco-Ortega. J, Park SJ, Santos-Guerra A, Benabid A, Jansen RK 2001.** Origin and evolution of the endemic *Macaronesian Inuleae* (Asteraceae): evidence from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72: 77-97.
- Ganz T. 2003.** Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Rev. Immunol.*, 3: 710-720.
- Gausson H, Leroy F. 1982.** Précis de botanique (Végétaux supérieurs). 2<sup>ème</sup> édition, Masson, pp 424-426.
- Gherib M, Atik Bekkara ., Bekhechi C, Bighelli A, Casanova J, Tomi F. 2014.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Algerian *Warionia saharae* Benth. & Hook., *Journal of Essential Oil Research*, 26 (5) : 385-391.
- Gill AO, Holley RA. 2004.** Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 : 5750-5755.
- Goossens H, Guillemot D, Ferech M, Schlemmer B, Costers M, van Breda M, Baker L J, Cars O, Davey P 2006.** National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 62: 373-379.
- Guignard. JL 1994.** Abrégé botanique. 9<sup>ème</sup> édition, Masson, pp 203-204.
- Guignard. JL, Dupont F. 2007.** Botanique: Systématique moléculaire. 13<sup>ème</sup> éd. Masson, pp 237.
- Günther H. (1994).** La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, Masson, Paris.
- Hanbali FE, Akssira M, Ezoubeiri A, Gadhi CE, Mellouki F, Benherraf A, Blazquez AM, Boira H. 2005.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L. *J. Ethnopharmacol.*, 99 : 399-401.
- Hedges LM, Wilkins CL. 1991.** Components analysis of eucalyptus oil by Gas Chromatography-Fourier Transform-Infrared Spectrometry-Mass Spectrometry. *J.Chromatogr. Sci.*, 29 : 345-350.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, von Wright A. 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 3590-3595.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B. 1997.** Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique. Masson, Paris.
- Heymann H, Yasuhiro T, Tohr K, Sutardjo S. 1994.** Constituents of *Sindora Sumatrana* Miq. Isolation and NMR Spectral analysis of sesquiterpenes from Dried Pods. *Chem. Pharm. Bull.*, 42 (1): 138-146.
- Hilmi F, Sticher O, Heilmann J. 2003.** New cytotoxic sesquiterpene lactones from *Warionia saharae*. *Planta Med.*, 69: 462-464.

- Inouye S, Watanabe M, Nishiyama Y, Takeo K, Yamaguchi H. (1998).** Antisporulating and respiration-inhibitory effect of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses*, 41: 403-410.
- Iob A, Buenafe R, Abbas NM. 1998.** Determination of oxygenates in gasoline by FTIR. *Fuel*, 77: 1861-1864.
- Jafri MA, Farah, Javed K, Singh S. 2001.** Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb). *J. Ethnopharmacol.*, 75: 89-94.
- Jennings W, Shibamoto T. 1980.** Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Jovanovich H.B. Ed., Academic Press, New York.
- Joffin JN, Leyral G. 2001.** Microbiologie Technique. Dictionnaire des techniques. *Collection Biological Technique*, 3<sup>ème</sup> édition, CNDP, pp 312.
- Joulain D. 1994.** Methods for analyzing essential oils. Modern analysis methodologies: use and abuse. *Perfumer & Flavorist*, 19: 5-17.
- Joulain D, König WA. 1998.** *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*: E.B.-Verlag, Hamburg.
- Joulain D, Laurent R. 1989.** Two closely related sesquiterpenols: 1-endobourbonanol and 1,6-germacradien-5-ol. *J Essent Oil Res.*, 1: 299-301.
- Kalemba D, Kunicka A. 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 10 : 813-829.
- Karioti A, Vrahi HT, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou LD, Skaltsa H. 2006.** Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.*, 72: 1330-1334.
- Katinas L, Tellería MC, Susanna A, Ortiz S. 2008.** *Warionia* (Asteraceae): a relict genus of Cichorieae? *Jard. Bot. de Mad.*, 65 : 367-381.
- Kilian N, Gemeinholzer B, Lack HW. 2009.** *Cichorieae*. in Systematics. Evolution, and Biogeography of Compositae. Edit. V.A. Funk, A. Susanna, T.F. Stuessy and R.J. Bayer, *International Association for Plant Taxonomy, Vienna*, pp 343-383.
- König WA, Hochmuth DH, Joulain D. 2001.** Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1. Institute of Organic Chemistry: Hamburg.
- Kordali S, Cakir A, Mavi A, Kilic H, Yildirim A. 2005.** Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1408-1416.
- Kordali S, Kotan R, Cakir A. 2007.** Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes in-vitro as plant disease control agents. *Allelopathy J.*, 19: 373-392.
- Kováts E. (1965).** Gas chromatographic characterisation of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*, 1: 229-247.

- La Torre GL, Saitta M, Vilasi F, Pellicanò T, Dugo G. 2006.** Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection. *Food Chem.*, 94: 640-650.
- Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 453-462.
- Lange G, Schultze W. 1988.** Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in Bioflavour'87, P. Schreier Ed., W. de Gruyter & Co.: Berlin, New-York, pp 115-122.
- Leandro SM, Tiselius P, Queiroga H. 2006.** Growth and development of nauplii and copepodites of the estuarine copepod *Acartia tonsa* from southern Europe (Ria de Aveiro, Portugal) under saturating food conditions. *Marine Biology*, 150: 121-129
- Lesueur D, Bighelli A, Casanova J, Tran Minh Hoi, Thai Tuy Thai. 2009.** Composition of the essential oil of *Piper bavinum* C. DC. from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.*, 21: 16-18.
- Levy SB., Marshall B. 2004.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.*, 10: 122-129.
- Liang YZ, Xieb P, Chan K. 2004.** Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr. B.*, 812: 53-70.
- Liu LL, Yang JL, Shi YP. 2010.** Phytochemicals and Biological Activities of *Pulicaria* Species. *Chemistry & Biodiversity*, 7: 327-349.
- Longevialle P. 1981.** Spectrométrie de masse des substances organiques, *Masson*, Paris.
- Mahfouz M, Ghazal A, El-Dakhakhny M, Ghoneim MT. 1973.** Pharmacological studies on the active principle isolated from *Pulicaria dysenterica*. *J. of Drug Research*, 5: 151-172.
- Maia JG, Andradeb EH, Graças M, Zoghbib B. 2004.** Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Food Chem.*, 85: 195-197.
- Maltezou HC, Giamarellou H. 2006.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 27: 87-96.
- Mantle D, Anderton JG, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry EK. 1998.** Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 121: 385-391.
- Maragakis LL, Perencevich EN, Cosgrove SE. 2008.** Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 6: 751-763.
- Marino M, Bersani C, Comi G. 2001.** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 187-195.

- Marquier ZV. 2002.** Qualité des huiles essentielles en désinfection préventive : Normalisation-protection des chémotypes, les contaminants biologiques des biens culturels, Musée Nationale d'Histoire Naturelle et Ed. Scientifiques et Médicales, Elsevier, pp 333-343.
- Masada Y. 1976.** Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. *John Wiley & sons*, New York.
- May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL. 2000.** Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45: 639-643.
- Mbarek LA, Mouse HA, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Zyad A. 2007.** Anti-tumor properties of black seed (*Nigella sativa* L.) extracts, Anti-tumor effect of black seed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 40: 839-847.
- Mc Lafferty FW, Michnowicz JA. 1992.** State-of-the-art GC-MS. *Chemtech.*, pp 182-189.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. 1994.** Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6<sup>th</sup> ed., Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co.: Newfield.
- Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. 2008a.** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part I: Leaf oil. *J. Essent. Oil Res.*, 20: 32-38.
- Mecherara-Idjeri S, Hassani A, Castola V, Casanova J. 2008b.** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria Part II: fruit oil. *J. Essent. Oil Res.*, 2 : 104-107.
- Mondello L, Dugo P, Bartle KD. 1995.** Automated HPLC-HRGC: A Powerful Method for Essential Oil Analysis. Part V. Identification of Terpenes Hydrocarbons of Bergamot, Lemon, Mandarin, Sweet Orange, Bitter Orange, Grapefruit, Clementine and Mexican Lime Oils by Coupled HPLC-HRGC-MS (ITD). *Flavour Fragr. J.*, 1: 33-42.
- Monti D, Chetoni P, Burgalassi S, Najarro M, Sætton MF, Boldrini E. 2002.** Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse Umezu T (1999) Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 64 : 35-40.
- Mroczek T, Ndjoko K, Glowniak K, Hostettmann K. 2004.** On-line structure characterization of pyrrolizidine alkaloids in *Onosma stellulatum* and *Emilia coccinea* by liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1056: 91-97.
- Munari F, Dugo G, Cotroneo A. 1990.** Automated On-line HPLC-HRGC with Gradient Elution and Multiple GC Transfer Applied to the Characterization of Citrus Essential Oils. *J. High Resol Chromatogr.*, 13 : 56-61.
- Mundina M, Vila R, Tomi F, Gupta MP, Adzet T, Casanova J, Cañigueral S. 1998.** Leaf essential oils of three Panamanian Piper species. *Phytochem.*, 47: 1277-1282.

- Nakamura CV, Ishida k, Faccin LC, Filho BD, Cortez DG, Rozental S, Souza WD, Nakamura TU. 2004.** *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L., against four *candida* species. *Research in Microbiology*, 155 : 579-586.
- National Institute of Standards and Technology. 1999.** PC Version 1.7 of *The NIST/EPA/NIH mass spectral library*. Perkin-Elmer Corporation: Norwalk, CT.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2000.** The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Prod. Rep.*, 17: 175-285.
- Newman DJ, Cragg GM., Snader KM. 2003.** Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66: 1022-1037.
- Nickavar B, Mojab F, Javidniab F, Amoli MAR. 2003.** Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z. Naturforsch.*, 58 629-631.
- Novak P, Tepeš P, Fistrić I, Bratoš I, Gabelica V. 2006.** The application of LC-NMR and LC-MS for separation and rapid structure elucidation of an unknown impurity in 5-aminosalicylic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40: 1268-1272.
- Núñez CV, Roque NF. 1999.** Sesquiterpenes from the stem bark of *Guarea guidonia* (L.) sleumer (Meliaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 11: 439-440.
- Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Gabriel J, Piette P, Begin A. 1997.** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oil against six meat spoilage organisms. *J. of Food Microbiology*, 37: 155-162.
- Ouraini D, Agouni A, Alaoui MI, Alaoui K, Alaoui MA, Belabbas MA. 2007.** Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus satureoides* L, et de *Mentha pulegium* L, comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, 1: 6-14.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2007.** Inhibitory effect of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria : *E coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414-420.
- Padrini F, Lucheroni MT. 1996.** Le grand livre des huiles essentielles : Guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromassage énergétique avec plus de 100 photographies. *Ed. De Vecchi*, pp 15.
- Paolini J, Costa J, Bernardini A-F. 2005.** Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionisation mass spectrometry. *J. chromatogr. A.*, 1076: 170-178.
- Paolini J, Muselli A, Bernardini A-F, Bighelli A, Casanova J, Costa J. 2007.** Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour Fragr. J.*, 22: 479-487.
- Paré JRJ, Sigouin M, Lapointe J. 1990.** Extraction de produits naturels assistée par microondes. *Brevet européen*, EP 398798.

- Paster M, Menashera M, Ravid U, Juven B. 1995.** Antifungal activity of oregano and Thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. of food Protection*, 58: 81-85.
- Pauli A. 2001.** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, 3: 126-133.
- Pessini GL, Prado DF, Celso B, Nakamura V, Cortez DA. 2003.** Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C. DC.) yunk. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, pp 98.
- Pfaller R, Steger HF, Rassow J, Pfanner N, Neupert W. 1988.** Import pathways of precursor proteins into mitochondria: multiple receptor sites are followed by a common membrane insertion site. *J. Cell Biol.*, 767: 2483-2490.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 1996.** Microbiology. *Third edition*, Mc Graw-Hill, New York. pp 1014.
- Pusecker K, Albert K, Bayer E. 1999.** Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A.*, 836: 245-252
- Quézel P. et Santa S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. *Tome II Ed. CNRS*, Paris.
- Ramaut JL, Hofinger M, Dimbi R, Corvisier M. 1985.** Main constituents of the essential oil of *Warionia saharae* Benth and coss. *Chromatographia*, 20: 66-69.
- Rasooli I, Owlia P. 2005.** Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistr*, 66: 2851-2856.
- Ravandeh M, Valizadeh J, Noroozifar M, Khorasani-Motlagh M. 2011.** Screening of chemical composition of essential oil, mineral elements and antioxidant activity in *Pulicaria undulata* (L.) C. A. Mey from Iran. *J. of Medicinal Plants Research*, 5: 2035-2040.
- Reverchon E, De Marco I. 2006.** Supercritical fluid extraction and fractionation of natural Matter. *J. of Supercritical Fluids*, 38: 146-166.
- Rezzi S, Bighelli A, Castola V, Casanova J. 2002.** Direct Identification and Quantitative Determination of Acidic and Neutral Diterpenes Using <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy. Application to the Analysis of Oleoresin of *Pinus nigra*. *Appli. Spectrosc.*, 56: 312-317.
- Rojas-Escudero E, Alarcón-Jiménez A-L, Elizalde-Galvan P, Rojo-Calleja F. 2004.** Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *J Chromatogr. A.*, 1027: 117-120.
- Rossi PG. 2003.** Caractérisation et valorisation des produits issus de la biomasse : activité biologique des huiles essentielles. Université de Corse, pp 2.

- Salgueiro LR, Vila R, Tomas X, Tomi F, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. 1995.** Chemical polymorphism of the essential oil of *Thymus carnosus* from Portugal. *Phytochem.*, 38: 391-396.
- Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Figueiredo AC, Barroso JG, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. 1997a.** Variability of the essential oil of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochem.*, 45: 307-311.
- Salgueiro LR, Vila R, Tomi F, Tomas X, Cañigüeral S, Casanova J, Proença da Cunha A, Adzet T. 1997b.** Composition and intraspecific variability of the essential oil of *Thymus camphorates*. *Phytochem.*, 45: 1177-1183.
- Sandra P, Bicchi C. 1987.** Chromatographic methods-Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, Heidelberg, Verlag: New York.
- Sasaki TA, Wilkins CL. 1999.** Gas chromatography with Fourier transform infrared and mass spectral detection. *J. Chromatogr. A.*, 842: 341-349.
- Schultze W, Lange G, Schmaus G. 1992.** Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flav. Fragr. J.*, 7: 55-64.
- Sellam K, Ramchoun M, Alem C, Khallouki F, El-Moualij B, El Rhaffari L. 2012.** Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of *Warionia saharae* from Oases of Morocco. In Gas Chromatography-Biochemicals, Narcotics and Essential Oils. Publisher: *InTech. Rijeka, Croatia*, pp 213-220.
- Senatore F, Arnold NA, Piozzi F. 2004.** Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr. A.*, 1052: 237-240.
- Shin S, Kim JH. 2005.** *In vitro* inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.*, 28: 897-901.
- Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y, Guolin Z. 2005.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Chrysanthemum indium*. *J. of Ethno.*, 96: 151-158.
- Siani AC, Ramos MF, Menezes-de-Lima OJR, Dos-Santos RB, Fernandez-Ferreira, Soares RO, Rosas EC, Susunaga GS, Guimaraes AC, Zoghbi MG, Henriques MG. 1999.** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.*, 66: 57-69.
- Singh SB, Barrett JF. 2006.** Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.*, 71: 1006-1015.
- Smallfield B. 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, Number 45, pp 4.
- Soussy CJ. 1997.** Etat actuel de la résistance aux antibiotiques. *Médecine Thérapeutique*, 3: 53-45.

- Svoboda KP, Hampson JB. 1999.** Bioactivité of essential oils of selected. Temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant biology department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK. 56, KA 65 HW.
- Tan YT., Darren J. 2000.** Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol. Med. Today*, 6: 309-314.
- Tanira MO, Ali BH, Bashir AK, Wasfi IA, Chandranath I. 1996.** Evaluation of the relaxant activity of some United Arab Emirates plants on intestinal smooth muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48: 545–550.
- Teixeira Duarte MC, Mara Figueira G, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. 2005.** Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. of Ethnopharmacology*, 97: 305-311.
- Thi Tam N'G, Thi Thuam D, Bighelli A, Castola V, Muselli A, Richomme P, Casanova J. 2004.** *Baekkea frutescens* leaf oil from Vietnam: composition and chemical variability. *Flavour and fragrance Journal*, 19: 217-220.
- Thomaidis NS, Georgiou CA. 1999.** Edible oil analysis by flow injection. *Lab. Autom. Inf. Manag.*, 34: 101-114.
- Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J. 2010.** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Phytomédecine*, 17: 142-145.
- Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. 1995.** Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.*, 1 : 25-34.
- Tomi F, Casanova J. 2006.** 13-C, NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae. A review. *Acta Horticulturae*, 723: 185-192.
- Tori M, Ohara Y, Nakashima K, Sono M. 2001.** Thymol derivatives from *Eupatorium fortune*. *J. Nat. Prod.*, 64: 1048-1051.
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG., Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. 2005.** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 2474-2478.
- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R. 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1561-1568.
- Unlu M, Daferera D, Donmez E, Polissiou M, Tepe B, Sokmen A. 2002.** Composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.*, 83: 117-121.
- Van Bruijnsvoort M, Ottink SM, Jonker KM, de Boer E. 2004.** Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1058: 137-142.

- Van Den Dool H, Kratz PD. 1963.** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.*, 11: 463-471.
- Vernin G, Boniface C, Metzger J, Guiglione C, Hammoud A, Suon K-N, Fraisse D, Parkanyl C. 1988.** GC-MS-Specma bank analysis of *J. communis* needles and berries. *Phytochem.*, 27: 1061-1064.
- Victoria M, Elipe S. 2003.** Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta.*, 497: 1-25.
- Wajs-Bonikowska A, Stojakowska A, Kalemba D. 2012.** Chemical composition of essential oils from a multiple shoot culture of *Telekia speciosa* and different plant organs. *Nat Prod Commun.* (ISSN: 1934-578X), 7: 625-8.
- Wan J, Wilcock A, Coventry MJ. 1998.** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 152-158.
- Wang Y, Jinming Li, Hao Wang, Da-Qing Jin, Hongqiang Chen, Jing Xu, Yasushi Ohizumi, Yuanqiang Guo. 2014.** Thymol derivatives from *Eupatorium fortunei* and their inhibitory activities on LPS-induced NO production. *Phytochemistry Letters*, 7: 190-193.
- Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. 2005.** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76: 233-2.
- Waridel P, Wolfender J-L, Lachavanne J-B., Hostettmann K. 2004.** Identification of the polar constituents of Potamogeton species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLCMSn and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane glycoside. *Phytochem.*, 65: 2401-2410.
- Watillon C, Gaspar T, Hofinger M, Ramaut JL. 1987.** La micropropagation de *Warionia saharae* Benth. & Coss. *Al Biruniya*, 4: 35-38.
- Weremczuk-Jezyna I, Kalemba D, Wysokin'ska H. 2011.** Constituents of the essential oil from hairy roots and plant roots of *Arnica montana*. *J. Essent. Oil Res.*, 23: 91-97.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 1996.** New Sesquiterpene Ethers from Vetiver Oil. *Liebigs Ann.*, 7: 1195-1199.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 1997b.** New cis-Eudesm-6-ene Derivatives from Vetiver Oil. *Liebigs Ann.*, 7: 1783-1787.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 2000a.** 1,7-Cyclogermacra-1(10),4-dien-15-al, a Sesquiterpene with a Novel Skeleton, and Other Sesquiterpenes from Haitian Vetiver Oil. *Flavour Fragr. J.*, 15: 61-83.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D. 2000b.** Analysis of the Polar Fraction of Haitian Vetiver Oil. *Flavour Fragr. J.*, 15: 153-173.
- Weyerstahl P, Marschall H, Splittgerber U, Wolf D, Surburg H. 2000c.** Constituents of Haitian Vetiver Oil. *Flav. Fragr. J.*, 15: 395-412.

- Weyerstahl P, Marschall H, Weirauch M, Thefeld K, Surburg H. 1998.** Constituents of the commercial Labdanum oil. *Flavour fragr. J.*, 13: 295-318.
- Weyerstahl P, Schlicht V. 1997.** Synthesis of rac-Bisabola-3(15), 10-dien-7-ol. *Liebigs Ann.*, 8: 1789-1790.
- Williams CA, Harborne JB., Greenham J.R. 2000.** Geographical variation in the surface flavonoids of *Pulicaria dysenterica*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 28: 679-687.
- Williams CA, Harborne JB, Greenham JR, Grayer RJ, Kite C, Eagles J. 2003.** Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. *Phytochemistry*, 64: 275–283.
- Williamson M, Neuhaus D. 1989.** The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis, VCH, New York.
- Wolfender JL, Ndjoko K, Hostettmann K. 1998.** LC/NMR in natural products chemistry. *Current Organic Chemistry*, 2: 575-596.
- Yagupsky P. 2006.** Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 25: 974-976.
- Zee OP, Kim DK., Lee KR. 1998.** Thymol derivatives from *Carpesium divaricatum* *Archives of Pharmacol. Research*, 21: 618–620.
- Zhang D, Christianson J, Liu Z-X, Tian L, Choies CS, Neschen S, Dong J, Wood PA, Shulman GI. 2010.** Resistance to high-fat diet-induced obesity insulin resistance in mice with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Cell Metab.*, 11: 402-411.
- Zhao Jei, Ya Li, Quan Liu, Kun Gao. 2009.** Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the roots of *Inula hupehensis*. *Food Chemistry*, 120: 512–516.
- Znini M, Majidi L, Laghchimi A, Paolini J, Hammouti B, Costa J., Bouyanzer A, Al-Deyab SS. 2011.** Chemical Composition and Anti-Corrosive Activity of *Warionia saharae* essential oil against the corrosion of mild steel in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6: 6699 – 6717.
- Znini M, Cristofari G, Majidi L, El Harrk A, Paolini J., Costa J. 2013a.** In vitro Antifungal Activity and Chemical Composition of *Warionia saharae* Essential Oil against 3 Apple Phytopathogenic Fungi. *Food Sci. Biotechnol.*, 22: 1-7.
- Znini M, Cristofari G, Majidi L, Paolini J, Desjobert JM, Costa J. 2013b.** Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *LWT-Food Science and Technology*, 54: 564-569.
- Zupanc M, Prošek M, Dušan M. 1992.** Combined CI and EI Mass Spectra in the Analysis of Essential Oils. *J. High Resol. Chromatogr.*, 15: 510-513.

# **ANNEXES**

**Annexe 1 : Composition chimique des 16 échantillons de *Warionia saharae* (Novembre)**

Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	Ain Ourka (%)										Tiout (%)					Moghrar (%)				
		AO1	AO2	AO3	AO4	AO5	AO6	TI	T2	T3	T4	T5	MI	M2	M3	M4	M5				
Ethyl-2-méthyl butyrate	830	Tr	0,4	0,5	0,3	0,2	0,1	Tr	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	Tr			
$\alpha$ -Thujène	930	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1	Tr	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	--			
$\alpha$ -Pinène	937	0,3	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	Tr	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	Tr			
Sabinène	970	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,1	Tr	--	--	--			
$\beta$ -Pinène	978	0,1	0,2	0,2	Tr	0,1	0,1	Tr	Tr	--	--	--	--	Tr	0,1	--	--	--			
Myrcène	980	--	--	--	0,1	--	--	--	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1			
$\alpha$ -Phellandrène	996	0,5	0,8	0,6	0,7	0,3	0,3	Tr	0,3	0,1	0,2	0,4	0,4	0,8	0,8	0,4	0,2	0,2			
$\alpha$ -Terpinène	1009	0,3	0,4	0,5	0,1	0,4	0,5	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	0,7	0,6	0,4	0,7	0,4	0,4			
<i>p</i> -Cymène	1011	0,6	0,7	0,7	0,5	0,5	0,4	0,2	0,6	0,5	0,3	0,4	0,8	1,2	1,1	0,7	0,3	0,3			
1,8-Cinéole	1020	1,1	1,4	1,5	0,9	1	0,9	1,1	1,3	1,2	0,9	1,6	2	2,6	2	1,9	0,7	0,7			
Limonène	1020	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1			
$\beta$ -(Z)-Ocimène	1030	0,1	Tr	--	--	Tr	--	Tr	--	Tr	Tr	Tr	--	Tr	--	--	--	--			
$\beta$ -(E)-Ocimène	1035	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1			
$\gamma$ -Terpinène	1048	0,4	0,5	0,6	0,3	0,4	0,3	0,5	0,7	0,6	0,4	0,6	1	1,2	0,8	1,2	0,5	0,5			
Terpinolène	1078	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2			
<b>Linalol*</b>	1083	<b>23,2</b>	<b>28,3</b>	<b>29,8</b>	<b>32</b>	<b>25,7</b>	<b>24,6</b>	<b>28,5</b>	<b>19,2</b>	<b>20,3</b>	<b>18,4</b>	<b>17,9</b>	<b>19,4</b>	<b>17,1</b>	<b>16,9</b>	<b>15,2</b>	<b>17,2</b>	<b>17,2</b>			
Hotriénol *	1083	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2			
Cis- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1106	--	--	--	0,1	--	--	0,1	--	--	--	--	Tr	--	0,1	--	--	--			
Trans-pinocarvéol	1121	--	--	--	Tr	--	--	Tr	--	--	--	--	--	--	0,1	--	--	--			
Pinocarvone	1144	--	--	Tr	--	--	--	--	--	--	Tr	0,1	0,1	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr			
Terpinèn-4-ol	1161	0,6	0,7	0,7	0,6	0,6	0,4	1,1	0,7	0,8	2	1,7	1,8	1,2	1,5	1,3	1,8	1,8			
$\alpha$ -Terpinéol	1171	1,4	1,3	1,4	1,4	1,2	1,0	2,9	1,3	1,9	3,6	2,7	2,1	1,6	1,9	1,7	3,0	3,0			
Myrténal	1177	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	Tr			

<i>Trans</i> Pipéritol	1191	1752	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	Tr	Tr	--	--	--	--	Tr
Nérol	1203	1793	0,1	0,1	0,1	--	0,1	0,1	--	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	0,2	0,3	0,5	0,1	0,3	0,1
Carvotanacétone *	1218	1673	1,3	0,9	1,0	1,2	1,3	1,0	1,4	0,6	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	5,7	8,0	1,8	1,9	1,1	1,0	1,5
Géranol*	1218	1840	1,0	0,8	0,8	0,9	0,7	0,8	2,9	1,4	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	3,1	2,2	0,9	0,7	0,9	0,8	2,6
Acétate d' $\alpha$ -terpinyle	1330	1684	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,4	0,1
Acétate de géranyle	1360	1744	0,1	0,1	--	--	0,1	--	Tr	0,2	0,2	0,1	Tr	--	0,2	0,2	Tr							
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllène	1415	1594	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	--	--	--	--	--	--	--	--	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	--	0,1
Géranyl acétone	1430	1865	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	Tr	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
$\alpha$ -Humulène	1465	1665	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
$\alpha$ -Curcumène	1479	1714	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	Tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Germacrène D	1487	1752	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
$\delta$ -Cadinène	1512	1752	0,5	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2
$\beta$ -Elémol	1532	2070	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	Tr
( <i>E</i> )-Nérolidol	1547	2034	28,9	24,8	26,1	27,0	30,5	29,7	17,9	22,2	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	15,7	18,5	24,4	25,7	27,6	29,9	29,9	24,8
Guaiol	1587	2093	Tr	0,1	0,1	Tr	0,1	Tr	--	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	--	--	Tr	Tr	Tr	0,1	Tr	0,1	0,1
$\alpha$ -Eudesmol	1616	2166	1,1	1,3	1,0	1,1	1,0	1,5	1,0	1,6	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	0,9	0,9	1	1,4	1,3	1,3	1,4	1,5	0,9
<b><math>\beta</math>-Eudesmol</b>	1635	2219	21,8	20,2	18,4	17,6	19,4	21,6	27,4	32,9	31	31	31	31	31	32,8	32,8	27,6	25,4	25,0	26,9	26,5	26,5	30,2
$\gamma$ -Eudesmol	1639	2234	1,4	1,4	1,2	1,3	1,3	1,4	1,3	1,5	Tr	Tr	Tr	Tr	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,5	1,5	1,5	1,3
2-Pentadecanone	1676	2013	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,4	0,4
2-Heptadecanone	1880	2223	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	1,0	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,5
<b>Total (%)</b>			<b>88,0</b>	<b>88,1</b>	<b>89,5</b>	<b>90,0</b>	<b>89,5</b>	<b>88,6</b>	<b>89,4</b>	<b>88,4</b>	<b>87,8</b>	<b>87,8</b>	<b>87,8</b>	<b>87,8</b>	<b>89,0</b>	<b>89,0</b>	<b>88,2</b>	<b>88,0</b>	<b>88,1</b>	<b>89,3</b>	<b>87,5</b>	<b>87,5</b>	<b>88,6</b>	<b>88,6</b>

L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire). Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BPI) et sur colonne polaire (BP20). Tr : trace.

**Annexe 2 : Composition chimique des huiles essentielles des 36 échantillons des trois stations *P. mauritanica* (Novembre)**

Composés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	AO1-1N	AO1-2N	AO1-3N	AO1-4N	AO1-5N	AO1-6N	AO2-1N	AO2-2N	AO2-3N	AO2-4N	AO2-5N	AO2-6N	AS-1N	AS-2N	AS-3N	AS-4N	AS-5N	AS-6N
α-Pinène	932	1025	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,5	0,3	0,8	0,7	0,3	0,4
Sabinène	967	1125	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
β-Pinène	973	1114	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
p-Cymène	1013	1276	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
Limonène*	1021	1203	Tr	0,1	0,1	Tr	0,1													
β-Phellandène*	1021	1211	0,1	0,1	Tr	0,1	0,1	0,1	Tr	Tr	Tr	0,1	0,1	Tr	0,1	Tr	0,1	0,1	0,1	0,1
Linalol	1084	1543	0,5	0,3	Tr	0,7	0,7	0,8	0,1	0,1	0,2	0,4	0,1	0,1	Tr	Tr	0,1	0,1	0,2	0,1
Camphre	1121	1515	Tr	Tr	Tr	--	Tr	--	Tr	0,1	Tr	Tr	Tr	Tr						
Terpinéol 4	1162	1598	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<b>Carvotanacétone</b>	<b>1226</b>	<b>1680</b>	<b>94,9</b>	<b>94,6</b>	<b>95</b>	<b>92</b>	<b>91,6</b>	<b>92,2</b>	<b>95,1</b>	<b>94,8</b>	<b>94,5</b>	<b>93,9</b>	<b>94,8</b>	<b>94,4</b>	<b>94,8</b>	<b>94,7</b>	<b>94,9</b>	<b>95,1</b>	<b>95,6</b>	<b>95,5</b>
Ascaridole	1230	1710	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2
Carvénone	1243	1585	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,9	0,9	0,7	0,6	1,0	0,9	0,5	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7
Thymol	1268	2198	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
Carvacrol	1277	2228	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1
2,5-Diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1399	1866	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1	0,3	0,4	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2
Isobutyrate de 8,9-déhydroxythymyle	1456	1935	0,1	0,1	Tr	Tr	Tr	Tr	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1
Isobutyrate de thymyle	1460	1896	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	--	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
( <i>E</i> )-Nérolidol	1547	2035	0,8	0,4	0,1	1,2	1,8	1,3	--	--	0,1	0,5	--	--	--	Tr	-	--	--	--
Oxyde de caryophyllène	1570	1976	0,2	--	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	--
α-Cadinol	1626	2228	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
β-Eudesmol	1635	2242	0,4	0,2	0,1	1,3	1,7	1,5	--	Tr	0,4	0,6	--	Tr	--	Tr	Tr	--	--	--
<b>Total (%)</b>			<b>98,4</b>	<b>97,4</b>	<b>97,2</b>	<b>97,1</b>	<b>97,4</b>	<b>97,5</b>	<b>97,7</b>	<b>97,4</b>	<b>97,4</b>	<b>97,6</b>	<b>97,6</b>	<b>97,1</b>	<b>97,1</b>	<b>97,5</b>	<b>97,8</b>	<b>98</b>	<b>97,7</b>	<b>97,9</b>

**Annexe 2 : Composition chimique des huiles essentielles des 36 échantillons des trois stations *P. mauritanica* (Mai)**

Composés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	AO - 1M	AO1- 2M	AO1- 3M	AO1- 4M	AO1- 5M	AO1- 6M	AO2- 1M	AO2- 2M	AO2- 3M	AO2- 4M	AO2- 5M	AO2- 6M	AS- 1M	AS- 2M	AS- 3M	AS- 4M	AS- 5M	AS- 6M
<i>α</i> -Pinène	932	1025	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	Tr	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1
Sabinène	967	1125	--	--	--	--	--	Tr	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>β</i> -Pinène	973	1114	--	--	--	--	--	Tr	--	--	--	--	--	--	Tr	--	Tr	--	0,1	--
<i>p</i> -Cymène	1013	1276	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Limonène*	1021	1203	Tr	0,1	Tr	0,1	Tr	0,1	--											
<i>β</i> -Phellandène*	1021	1211	Tr	Tr	0,1	Tr	0,1	0,1	Tr	0,1	Tr	0,1	0,1	Tr	0,1	Tr	Tr	0,1	0,1	0,1
Linalol	1084	1543	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,5	0,3	1,5	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Camphre	1121	1515	Tr	Tr	Tr	Tr	--	0,1	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	--	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
Terpinéol 4	1162	1598	Tr	Tr	Tr	--	0,1	Tr	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	--	Tr	Tr	0,0	Tr	0,0	Tr
<b>Carvotanacétone</b>	<b>1226</b>	<b>1680</b>	<b>92,3</b>	<b>93,2</b>	<b>93,3</b>	<b>91,9</b>	<b>96,1</b>	<b>89,2</b>	<b>94,6</b>	<b>94,1</b>	<b>94,2</b>	<b>90,6</b>	<b>95,6</b>	<b>96,1</b>	<b>95,7</b>	<b>95,3</b>	<b>96,1</b>	<b>94,8</b>	<b>96,1</b>	<b>93,3</b>
Ascaridole	1230	1710	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
Carvénone	1243	1585	0,6	0,7	0,7	0,6	0,5	0,4	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4
Thymol	1268	2198	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,4	0,3	0,2	0,6
Carvacrol	1277	2228	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3
2,5-Diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1399	1866	0,5	0,3	0,4	0,5	Tr	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2	Tr	0,2	Tr	0,2	0,1	0,2	Tr	0,5
Isobutyrate de 8,9-déhydroxythymyle	1456	1935	0,2	0,2	0,2	0,2	--	0,2	Tr	--	0,1	Tr	Tr	Tr	0,0	0,1	--	0,2	--	0,2
Isobutyrate de thymyle	1460	1896	0,3	0,2	0,2	0,3	--	0,3	--	--	--	Tr	--	0,1	Tr	0,1	0,1	0,2	Tr	0,3
( <i>E</i> )-Nérolidol	1547	2035	0,3	0,2	0,2	0,4	--	0,7	Tr	0,2	0,2	0,6	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,1	--	0,1
Oxyde de caryophyllène	1570	1976	0,2	0,4	0,4	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	Tr	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,5
<i>α</i> -Cadinol	1626	2228	Tr	--	--	Tr	--	Tr	--	--	--	--	--	--	--	--	--	Tr	--	Tr
<i>β</i> -Eudesmol	1635	2242	0,7	0,4	0,3	1,1	Tr	3,2	0,1	0,6	0,5	2,1	0,1	Tr	Tr	0,1	0,1	0,1	Tr	0,3
<b>Total (%)</b>			<b>96,7</b>	<b>97,1</b>	<b>97,4</b>	<b>96,9</b>	<b>97,8</b>	<b>97</b>	<b>96,7</b>	<b>97,6</b>	<b>97,4</b>	<b>97</b>	<b>97,6</b>	<b>97,9</b>	<b>97,5</b>	<b>97,5</b>	<b>98,1</b>	<b>96,7</b>	<b>98,1</b>	<b>97,1</b>

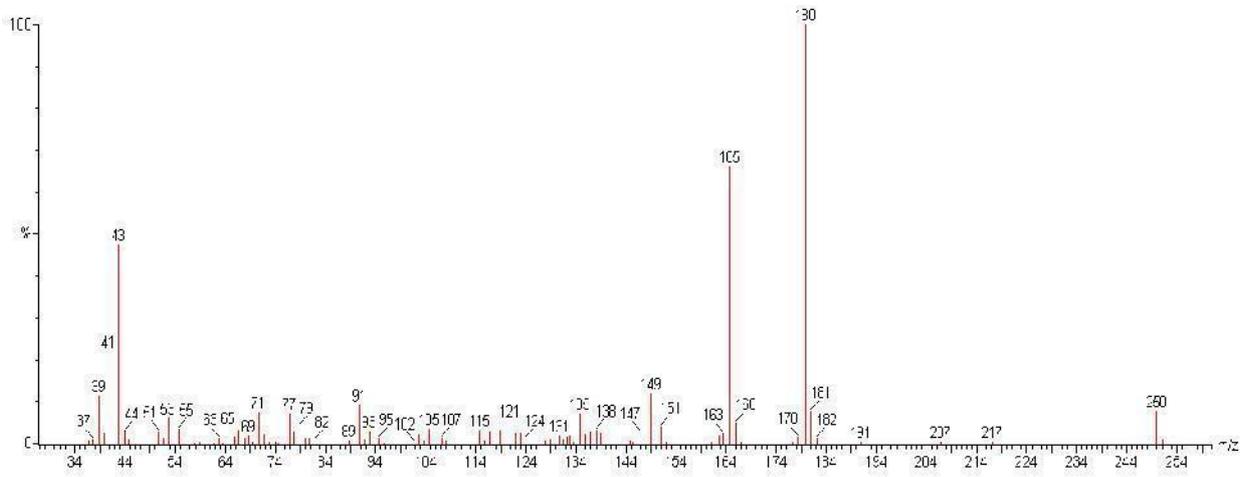
L'ordre d'éluion et les pourcentages donnés sont ceux sur colonne apolaire à l'exception des composés dont les noms sont suivis d'un astérisque (pourcentage sur colonne polaire). Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention sur colonnes apolaire (BP-1) et polaire (BP-20). Tr : trace. AO : Ain Ourka, AS : Ain Sefra.

**Annexe (3) : Composition chimique des huiles essentielles des 8 échantillons  
des racines de *P. mauritanica***

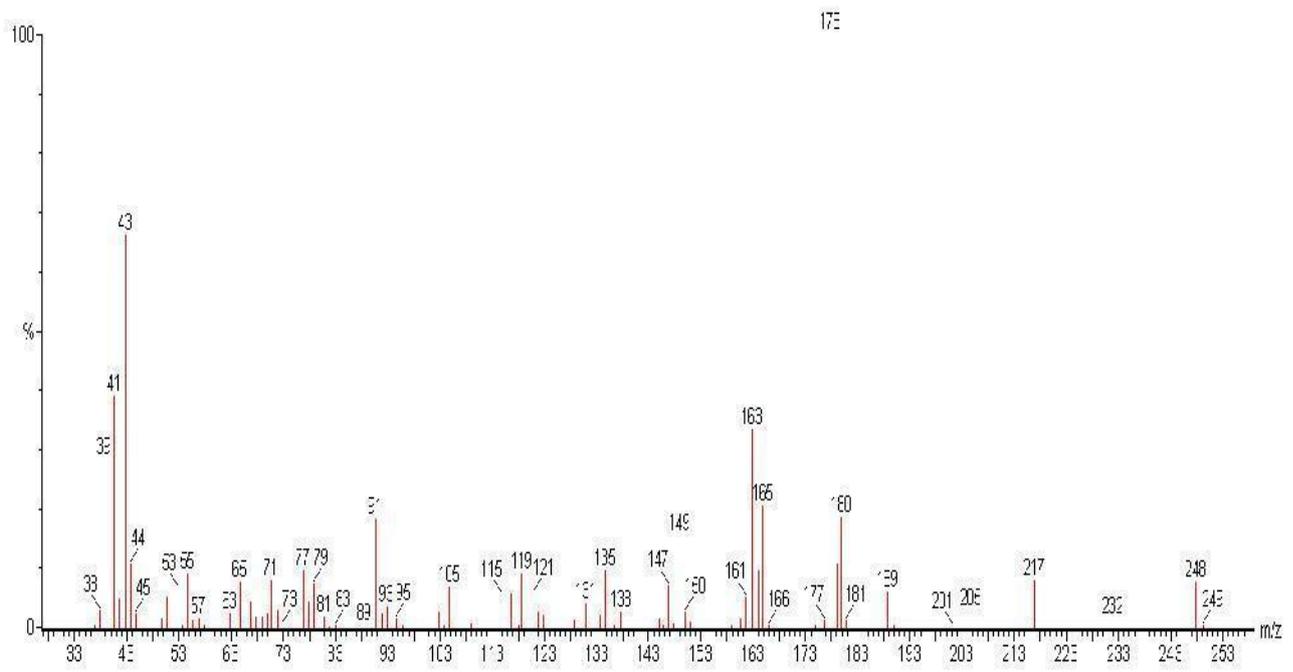
Composés	Ir <sup>a</sup>	Ir <sup>p</sup>	AO1	AO2	AO3	AO4	AS1	AS2	AS3	AS4
Camphène	943	1072	--	0,1	Tr	0,2	Tr	0,1	--	0,1
Myrcène	980	1160	--	--	--	--	--	--	Tr	--
<i>p</i> -Cymène	1012	1273	--	--	--	--	Tr	--	--	--
( <i>Z</i> )-β –Ocimène	1023	1230	--	--	--	--	Tr	--	--	Tr
Carvotanacétone	1221	1677	0,1	0,1	3,6	0,1	0,8	0,2	5,3	0,3
Acétate de bornyle	1270	1578	1,3	1,8	1,4	2,1	1,2	1,4	0,7	1,1
Carvacrol	1275	2204	--	--	--	--	--	--	--	--
7α-H-Silphiperfol-5-ène	1328	1425	Tr	0,1	0,1	0,1	--	0,1	0,1	0,1
Acétate de néryle	1347	1725	0,2	0,4	0,5	0,4	0,6	0,4	0,4	0,5
Silphin-1-ène	1350	1471	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	Tr	0,1
Modhéphène	1382	1522	0,9	1,5	1,8	1,5	1,8	1,5	1,2	1,6
α-Isocomène	1388	1534	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
<b>2,5-Diméthoxy-<i>p</i>-cymène</b>	1400	1866	<b>31,6</b>	<b>32,3</b>	<b>28,0</b>	<b>33,0</b>	<b>31,7</b>	<b>29,7</b>	<b>30,1</b>	<b>30,6</b>
β-Isocomène	1407	1567	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,6
8,9-Déhydroxy-2,5-diméthoxy- <i>p</i> -cymène	1416	1960	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
( <i>E</i> )-β –Caryophyllène	1419	1471	0,3	0,4	0,7	0,5	0,7	0,5	0,6	0,6
( <i>E</i> )-β –Farnésène	1450	1583	--	--	--	--	--	--	--	--
α-Humulène	1452	1668	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
Isobutyrate de 8,9-déhydrothymyl	1457	1935	1,6	1,4	2,3	1,4	2,9	1,7	2,8	2,6
Isobutyrate de thymyle	1461	1896	2,5	2,2	3,9	2,2	4,6	2,8	4,7	4,4
Isobutyrate de néryle	1471	1776	4,8	5,6	5,7	5,9	5,9	5,5	5,4	6,3
γ-Muuroloène	1477	1684	--	--	--	--	--	--	--	--
Isobutyrate de carvacryle	1487	1935	0,1	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,1
β –Bisabolène	1507	1719	Tr							
β-Sesquiphellandrène	1515	1771	0,6	0,8	0,5	0,7	0,6	0,6	0,4	0,5
8,9-Déhydrothymyl 2-méthylbutyrate	1550	2003	--	--	--	--	--	--	--	--
Thymyle 2-méthylbutyrate	1551	1807	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Oxyde de caryophyllène	1565	1976	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Tr	0,1	0,1
Modhéphane-3-one	1582	2005	4,5	4,4	5,4	4,4	5,9	5,1	5,1	5,8
τ-Cadinol	1624	2163	0,5	0,4	--	0,4	--	0,4	0,2	0,2
Isobutyrate de 6-méthoxythymyle	1659	2262	11	12,1	10,3	11,4	8,0	10,6	8,5	8,2
Isobutyrate de 6-méthoxy-8,9-déhydro-thymyle	1666	2259	2,6	2,7	2,6	2,4	1,6	2,4	1,6	1,8
Isobutyrate de 10-Isobutyryloxy thymyle	1880	2479	3,1	2,8	2,2	2,6	2,2	3,1	2,4	2,3
Isobutyrate de 10-Isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle	1883	2519	6,8	6,1	4,4	5,8	4,3	6,5	4,6	4,8
Isobutyrate de 10-(2-méthylbutyryloxy)-8,9-déhydrothymyle	1967	2601	0,8	0,8	0,6	0,7	0,7	0,8	0,7	0,8
Isobutyrate de 10-Isobutyryloxy-8,9-époxythymyle	1986	2759	10,6	8,2	8,7	8,5	6,3	9,8	8,1	7,4
Isobutyrate de 10-(2-méthylbutyloxy)-8,9-époxythymyle	2056	nd	1,7	1,4	1,5	1,5	1,2	1,7	1,5	1,4
Total (%)			<b>87,4</b>	<b>87,7</b>	<b>86,3</b>	<b>88,1</b>	<b>83,5</b>	<b>87,0</b>	<b>86,5</b>	<b>83,8</b>

L'ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire, <sup>a</sup> : pourcentages mesurés sur colonne apolaire. Tr : Trace < 0,05%.  
nd : Non déterminé. Ir<sup>a</sup> et Ir<sup>p</sup> : indices de rétention mesurés respectivement sur colonne apolaire (BP1) et polaire (BP20). AO : Aïn Ourka, AS : Aïn Sefra.

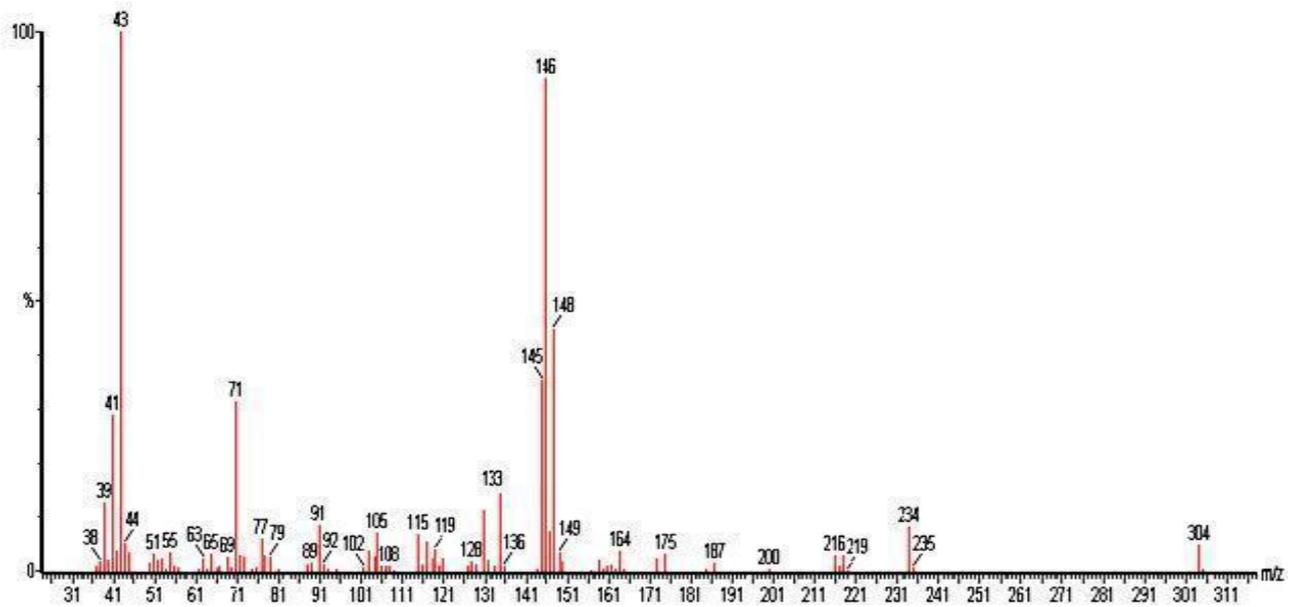
**Annexe 4 : Spectre de masse de l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle (31)**



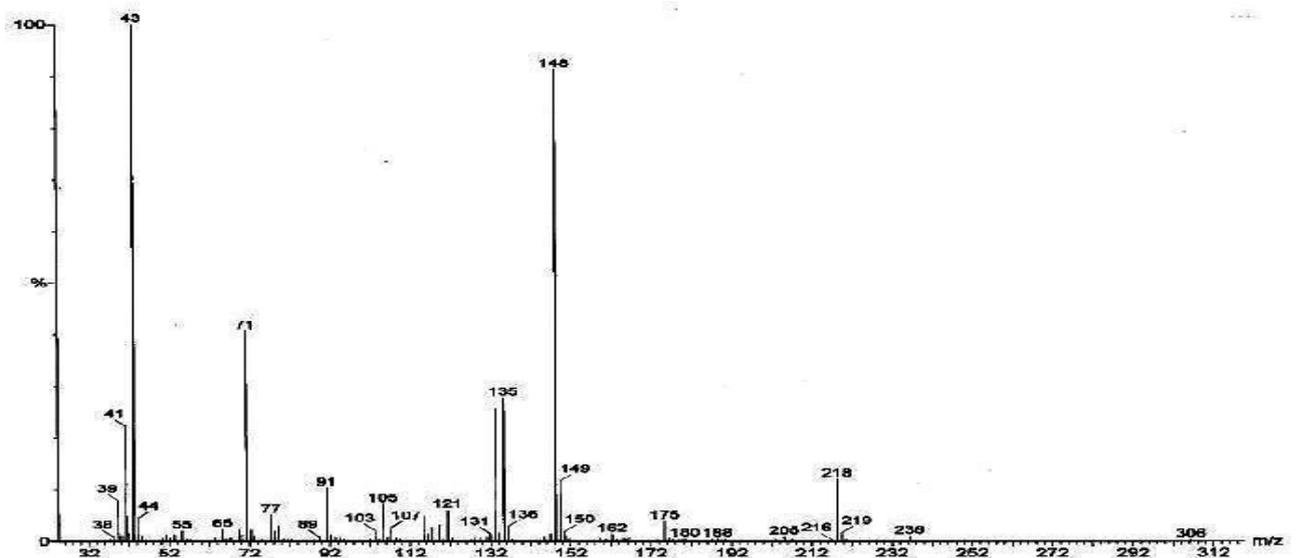
**Annexe 5 : Spectre de masse de l'isobutyrate 6-méthoxy-8,9-déhydrothymyle (32)**



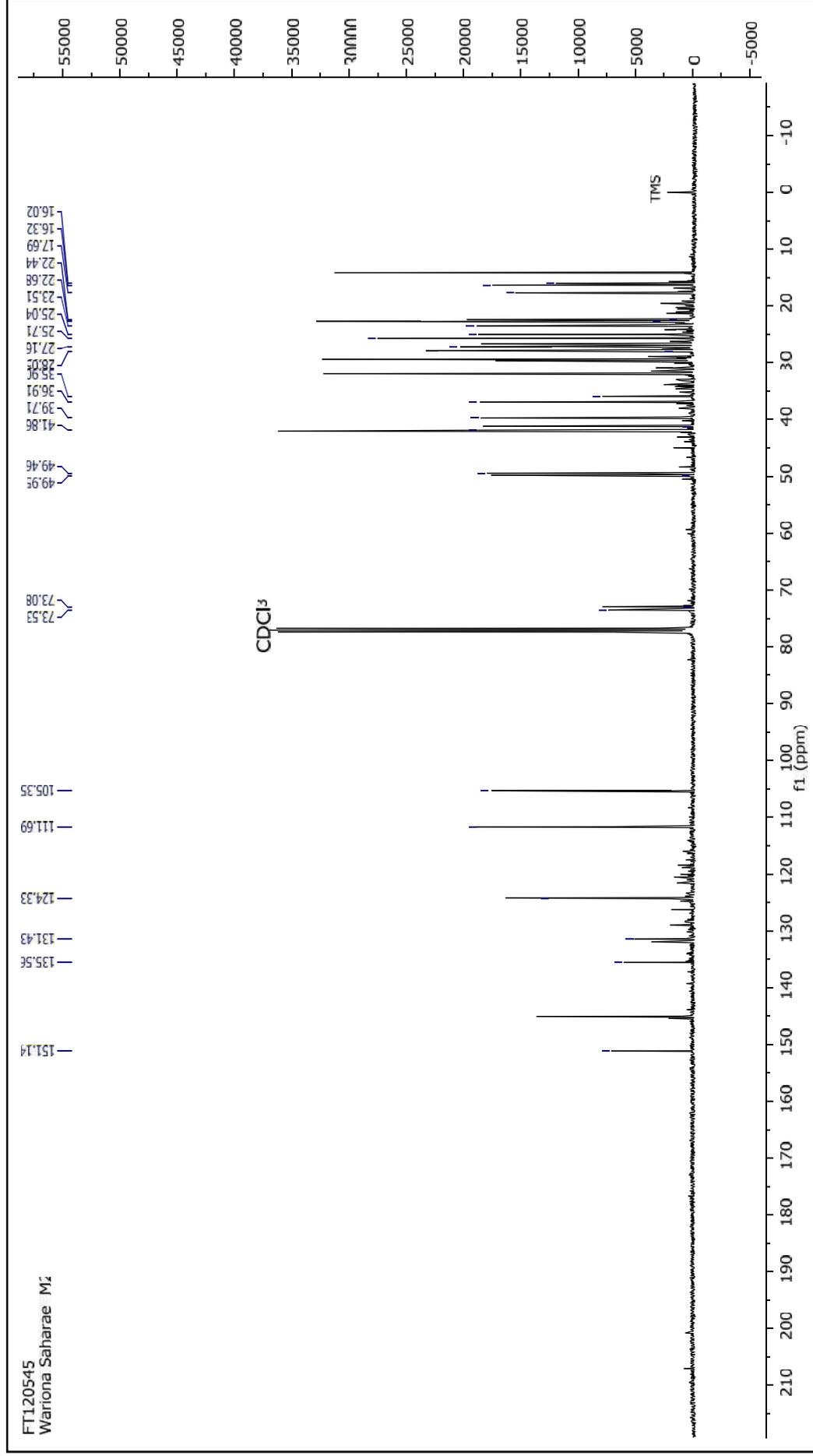
**Annexe 6 : Spectre de masse de l'isobutyrate de 10-isobutyryloxy-8,9-déhydrothymyle (34)**



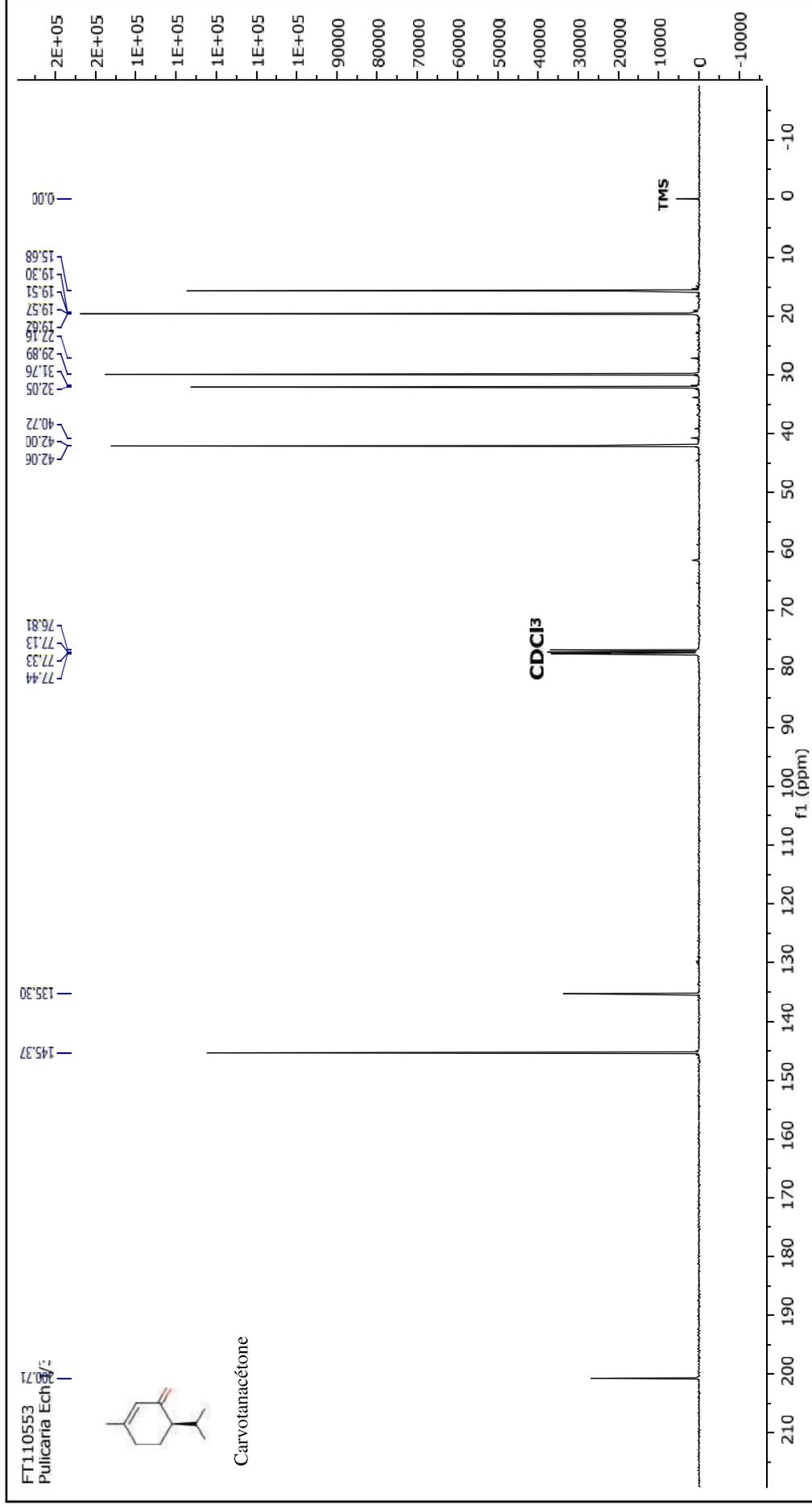
**Annexe 7 : Spectre de masse de l'isobutyrate de 10-isobutyryloxy thymyle (33)**



### Annexe 8 : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ de l'huile essentielle de *W. saharae*



Annexe 9 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de l'huile essentielle des parties aériennes de *P. mauritanica*



# **PUBLICATIONS**

This article was downloaded by: [gherib mohammed]

On: 01 August 2014, At: 12:59

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK

## Journal of Essential Oil Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/tjeo20>

### Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Algerian *Warionia saharae* Benth. & Hook.

Mohamed Gherib<sup>a</sup>, Fewzia Atik Bekkara<sup>a</sup>, Chahrazed Bekhechi<sup>a</sup>, Ange Bighelli<sup>b</sup>, Joseph Casanova<sup>b</sup> & Félix Tomi<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire des produits naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie

<sup>b</sup> Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

Published online: 30 Jul 2014.

**To cite this article:** Mohamed Gherib, Fewzia Atik Bekkara, Chahrazed Bekhechi, Ange Bighelli, Joseph Casanova & Félix Tomi (2014): Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Algerian *Warionia saharae* Benth. & Hook., Journal of Essential Oil Research, DOI: [10.1080/10412905.2014.937008](https://doi.org/10.1080/10412905.2014.937008)

**To link to this article:** <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2014.937008>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

## Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Algerian *Warionia saharae* Benth. & Hook.

Mohamed Gherib<sup>a</sup>, Fewzia Atik Bekkara<sup>a</sup>, Chahrazed Bekhechi<sup>a\*</sup>, Ange Bighelli<sup>b</sup>, Joseph Casanova<sup>b</sup> and Félix Tomi<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire des produits naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie; <sup>b</sup>Université de Corse-CNRS, UMR 6134 SPE, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

(Received 24 June 2013; accepted 12 June 2014)

The essential oil of aerial parts of *Warionia saharae* was obtained by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography/flame ionization detector (GC/FID), GC/mass spectrometry (GC/MS) and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR). In total, forty-three constituents, mainly oxygenated mono- and sesquiterpenes, were identified representing 89.2% of the total oil. Sixteen samples of essential oil of *W. saharae* collected in three locations exhibited similar chemical compositions showing a chemical homogeneity. The essential oil showed poor antifungal activity against filamentous fungi, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus flavus* with minimum inhibitory concentration (MIC) values between 4 and 8 µL/mL.

**Keywords:** *Warionia saharae* Benth. & Hook.; essential oil composition; antimicrobial activity; Algeria

### 1. Introduction

The monotypic genus *Warionia* Coss. (Asteraceae family, Cichorieae tribe) is the only member of the Warioniinae subtribe. *Warionia saharae* Benth. & Hook. is endemic to southeast Morocco and northwest Algeria (1). This is a corky trunk shrub with short stems, a thistle-like aromatic plant with white latex. Leaves are somewhat fleshy and alternate, subsessile, sinuate to pinnately partite, with triangular lobes and eroded-toothed. The capitula are homogamous and large (5–6 cm wide and 3–4 cm long) with tubular corollas and terminal, solitary yellow flowers, receptacle flat, epaleate, alveolate and glabrous; involucre phyllaries green, purple at the apex, the anthers are caudate and the style branches are dorsally covered by acute collecting hairs extending somewhat below the branches' bifurcation (2–4).

Phytochemical investigations were essentially conducted on Moroccan *W. saharae*. Chemical analyses on solvent extracts from aerial parts revealed that this species contains a large variety of compounds, mainly gainolides (5, 6), fatty acids, aliphatic hydrocarbons and oxygenated aliphatic compounds (7). Crude extracts of the plants showed anti-inflammatory and cytotoxic activities against KB cancer cells and against other cell types (5, 6, 8). The free radical scavenging activity of the ethanol extract has been measured (IC<sub>50</sub> = 182 µg/mL, by comparison IC<sub>50</sub> butylated hydroxytoluene, BHT = 10 µg/mL). The

ethanol extract showed poor antimicrobial activity against all tested microorganisms (minimum inhibitory concentration, MIC = 6.25–12.5 mg/mL) (9).

The chemical composition of the essential oils of *W. saharae* growing in different regions of Southern Morocco has been investigated. The oil composition was dominated by oxygenated sesquiterpenes. The first composition dates back to 1985 when Ramaut et al. (10) isolated and identified the three major constituents: β-eudesmol (42.25%), nerolidol (17.26%) and linalool (8.63%). These three compounds have been the most abundant components of *W. saharae* oils isolated from plants collected in various Moroccan localities and reported in the literature since that time. In contrast, the occurrence of minor components varied drastically from sample to sample.

The composition of an oil sample from Tata region, south of Morocco (11), was characterized by a high content of β-eudesmol (52.7%) followed by (*E*)-nerolidol (17.4%) and a lower content of linalool (5.1%). The authors identified various sesquiterpenes usually found in essential oils, among them guaiol accounted for 2.4%.

Seven oil samples isolated from plants harvested in various localities also contained β-eudesmol (30.0–45.6%), (*E*)-nerolidol (8.6–31.5%) and linalool (12.5–19.3%). Geraniol (1.4–3.9%) and α-terpineol (2.1–3.4%) were present in appreciable amounts. The occurrence of carvacrol (up to 1.4%), (*E*)-β-damasce-

\*Corresponding author. E-mail: bekhechichahrazed@yahoo.fr

none (up to 0.3%), agarospirol (up to 1.9%) and (*E*)-anethole (up to 0.3%) was also mentioned (12).

Another oil sample from Errachidia contained  $\beta$ -eudesmol (23.74%), (*E*)-nerolidol (17.95%) and linalool (16.79%), as well as 1,8-cineole (6.12%), *p*-cymene (3.8%), terpinen-4-ol (3.4%),  $\alpha$ -fenchol (2.6%) and caryophyllene oxide (1.9%). The authors mentioned the occurrence of ethyl 3-phenylpropionate as well as ethyl 8-fluorooctanoate, which is probably an artifact (13).

A second oil sample from the Tata region contained  $\beta$ -eudesmol (38.12%) and (*E*)-nerolidol (25.95%). In contrast with the previous reports, the presence of linalool was not mentioned, whereas linalyl acetate accounted for 1.7%. In this sample, the third major component was  $\delta$ -selinene (5.4%) surprisingly followed by a hexasiloxane derivative (4.6%), probably an artifact (9).

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity of essential oil of *W. saharae* has been measured at 21.5  $\mu\text{g/mL}$  (compared with 10.0  $\mu\text{g/mL}$  for BHT) (9). The antimicrobial activity has also been investigated (9, 13, 14) and will be discussed below.

Concerning Algerian *W. saharae*, only two studies are reported in the literature. The EtOAc extract contained phytosterols, flavonoids and coumarins, and it exhibited potent radical scavenging activity with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $6.98 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$  compared with the positive control quercetin,  $2.62 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$  (15). A short report mentioned the chemical composition of Algerian *W. saharae* essential oil that differed drastically from those of the Moroccan oil samples. The main compounds were  $\alpha$ -caryophyllan (33.65%),  $\beta$ -guaiene (06.27%),  $\delta$ -cadinene (27.93%), caryolan-1-ol (5.31%) and  $\gamma$ -eudesmol (2.83%) (16).

Therefore, the purpose of this study was to characterize *W. saharae* essential oil from Algeria. First, we carried out detailed analysis of a bulk sample, by combination of chromatographic and spectroscopic techniques. Second, we analyzed sixteen individual samples of aerial part oil of *W. saharae* harvested in three locations of the Nâama province (Western Algeria) to determine whether the Algerian plant produces a homogeneous essential oil or to show an eventual chemical variability.

## 2. Experimental

### 2.1 Plant material

Samples of *W. saharae* were collected during the flowering period in November 2010 in three locations in the Nâama province (Western Algeria): Aïn Ourka (six samples), Tiout (five samples) and Moghrar (five samples). Identification of the plant material was performed by Professor A. Marouf (University of Nâama, Algeria). A voucher specimen has been deposited at the

Laboratory of Natural Products (Department of Biology, University of Tlemcen, Algeria), under the accession no. A.3031.

The essential oil was obtained by hydrodistillation of 150–200 g of dried aerial parts, using a Clevenger-type apparatus for 3 hours. Yields have been calculated from dry material.

### 2.2 Analysis of the essential oils

Gas chromatography (GC) analyses were carried out with a Clarus 500 Perkin–Elmer Autosystem apparatus equipped with two flame ionization detectors (FIDs) and fused capillary columns (50 m  $\times$  0.22 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), BP-1 (polymethylsiloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The carrier gas was helium with a linear velocity of 0.8 mL/minute. The oven temperature was programmed from 60° to 220°C at 2°C/minute and then held isothermal (20 minutes). The injector temperature was 250°C (injection mode: split 1/60). Detector temperature: 250°C.

GC/mass spectrometry (GC/MS) analyses were carried out using a Agilent Technologie 7890A detector (quadrupole), directly coupled to a Agilent Technologie 5975C, equipped with a fused-silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu\text{m}$ ), HP-MS 5% phenylmethylsiloxane. Carrier gas, helium at 1 mL/minute; split, 1:80; injection volume, 0.2  $\mu\text{L}$ . The injection port was set at 250°C; the oven temperature was programmed from 60° to 250°C at 4°C/minute (52.5 minutes). Significant quadrupole MS operating parameters: ion source temperature, 150°C; electron impact ionization at 70 eV with scan mass range of 33–350 *m/z*.

$^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) analysis was performed on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer operating at 100.63 MHz for  $^{13}\text{C}$ , equipped with a 5-mm probe, in deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS).  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4  $\mu\text{s}$  (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 seconds for a 128K data table with a spectral width (SW) of 24,000 Hz (240 ppm); composite pulse decoupling mode; digital resolution 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans ranged between 2000 and 3000 for each sample, depending on the amount of oil available (around 40 mg in 0.5 mL of  $\text{CDCl}_3$ ).

Identification of the components was based on: (a) comparison of their GC retention indices (RI) on polar and apolar columns, determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software, Perkin-Elmer), with those of authentic samples and literature data; (b) computer search using digital libraries of mass spectral data

(17–20); and (c) comparison of the signals in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of essential oils with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of laboratory-developed software (21–24). This method is well suited to identification of compounds that possess close retention indices on polar and apolar columns and exhibit insufficiently differentiated mass spectra.  $^{13}\text{C}$  NMR allowed the identification of stereoisomers and thermolabile compounds.

### 2.3 Antimicrobial activity

#### Microbial strains

Antibacterial and antifungal activities of the essential oil of the aerial part were evaluated against two Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), and four filamentous fungi (*Cladosporium herbarum* MNHN 3369, *Fusarium oxysporum* MNHN 963917, *Alternaria alternata* MNHN 843390 and *Aspergillus flavus* MNHN 994294).

#### Screening of antibacterial activity

The agar diffusion method (25) was used for the determination of antimicrobial activities of the oils.

Briefly, a suspension of the tested microorganisms (1 mL of a suspension at  $10^6$  cells/mL and  $10^7$  cells/mL for *S. aureus*) was spread on the solid media plates, using Mueller–Hinton agar. Filter paper discs (6 mm in diameter) were impregnated with 15  $\mu\text{L}$  of the oil and 5  $\mu\text{L}$  dimethyl sulfoxide (DMSO) and placed on the surface of inoculated plates and, after being held at room temperature for 1 hour, they were incubated 24 hours at 37°C. Following incubation, zones of inhibition are measured (mm). Each test was performed in triplicate in at least three separate experiments. DMSO and antibiotics [ampicillin (10  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ) and oxacillin (1  $\mu\text{g}/\text{disc}$ ), BioMérieux] were used as controls.

Antifungal activity was studied by using a contact assay (*in vitro*), which produced hyphal growth inhibition (26, 27). Briefly, potato dextrose agar (PDA; 20 mL) plates were prepared using 9-cm diameter glass Petri dishes. Different concentrations of the essential oils were obtained in DMSO to give serial two-fold dilutions that were added to each well, resulting in concentrations of 2–10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (28). The final concentration of DMSO never exceeded 2%. A disc (6 mm diameter) of the fungal species was cut from one-week-old cultures on PDA plates and then the mycelia surface of the disc was placed upside down on the centre of a dish. Then, the plates were incubated in the dark at 25°C. The extension diameters (mm) of hyphae from centers to the sides of the dishes was measured after

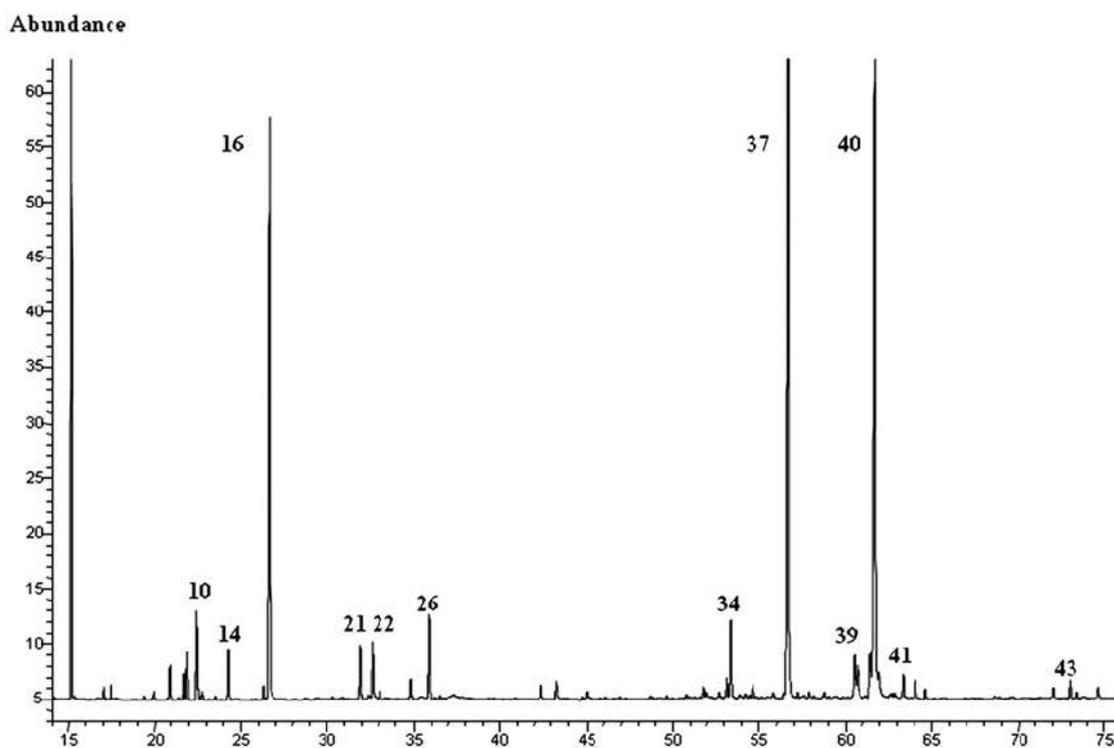


Figure 1. Gas chromatogram of essential oil of *Warionia saharae*. The numbered peaks are identified components (Table 1).

Table 1. Components of essential oil of *Warionia saharae* from Algeria.

	Components <sup>a</sup>	RI lit <sup>b</sup>	RIa <sup>c</sup>	RIp <sup>d</sup>	%	Identification mode	
1	Ethyl 2-methylbutyrate	843	830	nd	0.2	RI	MS
2	$\alpha$ -Thujene	932	930	1014	0.3	RI	MS
3	$\alpha$ -Pinene	936	937	1011	0.3	RI	MS
4	Sabinene	973	970	1127	0.1	RI	MS
5	$\beta$ -Pinene	978	978	1112	tr	RI	MS
6	Myrcene	987	980	1160	0.2	RI	MS
7	$\alpha$ -Phellandrene	1002	996	1166	0.8	RI	MS
8	$\alpha$ -Terpinene	1013	1009	1181	0.6	RI	MS
9	<i>p</i> -Cymene	1015	1011	1270	1.2	RI	MS
10	1,8-Cineole	1024	1020	1210	2.6	RI	MS
11	Limonene	1025	1020	1201	0.2	RI	MS
12	(Z)- $\beta$ -Ocimene	1029	1030	1225	tr	RI	MS
13	(E)- $\beta$ -Ocimene	1041	1035	1249	0.1	RI	MS
14	$\gamma$ -Terpinene	1051	1048	1245	1.2	RI	MS
15	Terpinolene	1082	1078	1282	0.4	RI	MS
16	Linalool*	1086	1083	1542	17.1	RI	MS
17	Hotrienol*	1083	1083	1566	0.3	RI	MS
18	<i>cis</i> - <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1108	1106	1549	tr	RI	MS
19	<i>trans</i> -Pinocarveol	1126	1121	1650	tr	RI	MS
20	Pinocarvone	1137	1144	1565	0.1	RI	MS
21	Terpinen-4-ol	1164	1161	1596	1.5	RI	MS
22	$\alpha$ -Terpineol	1176	1171	1689	1.6	RI	MS
23	Myrtenal	1172	1177	1624	0.2	RI	MS
24	<i>trans</i> -Piperitol	1193	1191	1752	tr	RI	MS
25	Nerol	1210	1203	1793	0.5	RI	MS
26	Carvotanacetone*	1220	1218	1673	2.2	RI	MS
27	Geraniol*	1220	1218	1840	0.9	RI	MS
28	$\alpha$ -Terpinyl acetate	1335	1330	1684	0.5	RI	MS
29	Geranyl acetate	1362	1360	1744	0.1	RI	MS
30	(E)- $\beta$ -Caryophyllene	1421	1415	1594	0.1	RI	MS
31	Geranyl acetone	1430	1430	1865	0.1	RI	MS
32	$\alpha$ -Humulene	1455	1465	1665	0.3	RI	MS
33	$\alpha$ -Curcumene	1480	1479	1765	0.2	RI	MS
34	Germacrene D	1487	1487	1714	0.5	RI	MS
35	$\delta$ -Cadinene	1520	1512	1752	0.4	RI	MS
36	$\beta$ -Elemol	1541	1532	2070	0.2	RI	MS
37	(E)-Nerolidol	1553	1547	2034	25.7	RI	MS
38	Guaiol	1593	1587	2093	0.1	RI	MS
39	$\gamma$ -Eudesmol	1618	1616	2166	1.3	RI	MS
40	$\beta$ -Eudesmol	1641	1635	2219	25.0	RI	MS
41	$\alpha$ -Eudesmol	1653	1639	2234	1.3	RI	MS
42	2-Pentadecanone	1688	1676	2013	0.5	RI	MS
43	2-Heptadecanone	1884	1880	2223	0.3	RI	MS
	Total identified				89.2		

Notes: <sup>a</sup>Order of elution and percentages of individual components are given on an apolar column (BP-1), except those with an asterisk (\*), percentages on polar column (BP-20). <sup>b</sup>RI lit, retention indices taken in the literature, ref. (30). <sup>c</sup>RIa, retention indices on apolar column. <sup>d</sup>RIp, retention indices on polar column.

five and seven days. MICs were determined as the concentration with no visible growth. Each test was carried out in triplicate. PDA plates containing DMSO were used as a negative control. In addition, PDA plates treated with nystacin (2–7.5  $\mu$ g/mL) were used as a positive control. MICs were determined as the concentration with no visible growth. When no mycelium growth was observed, the mycelium was transferred to a plate containing only PDA and incubated for three to five days, to determine whether the inhibition was fungistatic or fungicide (29).

### 3. Results and discussion

Essential oil samples have been obtained by the hydrodistillation of dry aerial parts of *W. saharae*. Yields of essential oil, calculated w/w versus dry material, ranged between 0.20% and 0.60%. We will first report on the detailed analysis of a bulk sample, carried out by a combination of chromatographic and spectroscopic techniques and on the composition of sixteen individual oil samples from the aerial part oil of *W. saharae* harvested in three locations of Western Algeria. Then, the antimicrobial activity of one oil sample will be also reported.

Table 2. Main components of sixteen samples of *Warionia saharae*.

Components	Mean $\pm$ SD (%)	Min. (%)	Max. (%)
<i>p</i> -Cymene	0.6 $\pm$ 0.3	0.2	1.2
1,8-Cineole	1.4 $\pm$ 0.5	0.8	2.6
$\gamma$ -Terpinene	0.6 $\pm$ 0.3	0.2	1.3
Linalool	22.1 $\pm$ 5.4	15.3	32.1
Terpinen-4-ol	1.1 $\pm$ 0.5	0.5	2.0
$\alpha$ -Terpineol	1.9 $\pm$ 0.7	1.2	3.7
Carvotanacetone	2.3 $\pm$ 2.3	0.7	9.3
Geraniol	1.7 $\pm$ 1.0	0.8	3.7
( <i>E</i> )-Nerolidol	24.7 $\pm$ 4.5	15.8	30.4
$\gamma$ -Eudesmol	1.2 $\pm$ 0.3	0.8	1.6
$\beta$ -Eudesmol	25.3 $\pm$ 5.0	17.6	32.9
$\alpha$ -Eudesmol	1.4 $\pm$ 0.1	1.2	1.5

### 3.1 Chemical composition

One oil sample was analyzed by GC (Figure 1) in combination with retention indices on two columns of different polarity GC(FID), by GC/MS and  $^{13}\text{C}$  NMR, following a computerized method developed in our laboratory (21–24) (Table 1). In total, forty-three compounds were identified, accounting for 89.2% of the entire composition. The composition was dominated by oxygenated sesquiterpenes (53.6%) followed by oxygenated monoterpenes (27.7%). As reported for Moroccan oils, the major components were (*E*)-nerolidol (25.7%),  $\beta$ -eudesmol (25.0%) and linalool (17.1%). Various oxygenated monoterpenes bearing the *p*-menthane skeleton were present in appreciable amounts: 1,8-cineole (2.6%), carvotanacetone (2.2%),  $\alpha$ -terpineol (1.6%) and terpinen-4-ol (1.5%). Acyclic monoterpenes included hotrienol, nerol, geraniol, geranyl acetate and geranyl acetone. Eudesmol isomers beside  $\beta$ -eudesmol were present as some of the main components:  $\gamma$ -eudesmol (1.3%) and  $\alpha$ -eudesmol (1.3%). 2-Pentadecanone (0.5%) and 2-heptadecanone (0.3%) were identified, as already mentioned (12, 14).

In order to characterize the essential oil of *W. saharae*, sixteen oil samples were isolated from plants harvested in three locations of western Algeria. All samples were analyzed by GC(RI) and by  $^{13}\text{C}$  NMR. The twelve main components are reported in

Table 2. A quantitative chemical variability was observed for the major components:  $\beta$ -eudesmol (17.6–32.9%), (*E*)-nerolidol (15.8–30.4%) and linalool (15.3–32.1%). Carvotanacetone (0.7–9.3%), geraniol (0.8–3.7%),  $\alpha$ -terpineol (1.2–3.7%) and 1,8-cineole (0.8–2.6%) were found to be the main other oxygenated monoterpenes present in appreciable amounts.

Our results are in agreement with previous studies relating to Moroccan *W. saharae* essential oils (9, 10, 12–14). In particular, the percentages of (*E*)-nerolidol and  $\beta$ -eudesmol were similar to those of the Moroccan samples except for a sample from Tata ( $\beta$ -eudesmol, 52.7%). The content of linalool was higher than that found in almost all Moroccan samples. Finally, the composition of our samples differed drastically from that of the Algerian *W. saharae* essential oil reported by Belboukhari et al., which was dominated by  $\alpha$ -caryophyllan (33.65%) and  $\delta$ -cadinene (27.93%) (16).

### 3.2 Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the essential oil of *W. saharae* was assayed against four bacteria and four filamentous fungi, using the agar disc diffusion method and direct contact, respectively (Tables 3 and 4).

The essential oil from aerial parts of *W. saharae* exhibited little or no activity against the tested bacteria (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* and *E. faecalis*, inhibition diameters = 10–13 mm). Our results are in agreement with those of Sellam et al. (13), who reported MIC values in the range of 5–20 mg/mL. In contrast, they differ from those of Amezouar et al. (9), who reported MICs of the oil in the range 0.031–0.25  $\mu\text{g/mL}$ .

Similarly, the essential oil of *W. saharae* was shown to possess poor antifungal activity. Indeed, the MIC values ranged between 4.0 and 8.0  $\mu\text{L/mL}$  for *A. alternata*. Our results are in agreement with those of Sellam et al. (13), who reported MICs of 2.5 and 5.0 mg/mL for *Candida albicans* and *Penicillium* sp., respectively, and with those of Znini et al. (14), who reported MICs >2  $\mu\text{L/mL}$  for *Alternaria* sp., *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*.

Table 3. Antibacterial activity of the essential oil of *Warionia saharae*.

Bacteria	Essential oil (15 $\mu\text{L/disc}$ )	Ampicillin (10 $\mu\text{g/disc}$ )	Oxacillin (1 $\mu\text{g/disc}$ )	Negative control (DMSO)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.0 $\pm$ 0.70	6.0 $\pm$ 0.00	6.0 $\pm$ 0.00	6
<i>Escherichia coli</i>	10.0 $\pm$ 1.67	15.0 $\pm$ 1.00	6.0 $\pm$ 0.00	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	13.2 $\pm$ 1.65	27.5 $\pm$ 0.70	16.3 $\pm$ 1.15	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	11.2 $\pm$ 1.30	20.0 $\pm$ 1.00	6.0 $\pm$ 0.00	6

Note: Mean values of the growth inhibition zones, in mm, including the disc diameter of 6 mm.

Table 4. Antifungal activity of the essential oil of *Warionia saharae*.

	Essential oil ( $\mu\text{L/mL}$ )	Nystatin ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Alternaria alternata</i>	4.0	6.00
<i>Fusarium oxysporum</i>	8.0	>7.50
<i>Aspergillus flavus</i>	8.0	6.00
<i>Cladosporium herbarum</i>	5.0	5.00

### Acknowledgements

This work has been performed within the cooperative program between the Universities of Abou Bekr Belkaïd (Tlemcen) and Pascal Paoli (Corsica). The authors gratefully acknowledge Dr. P. Paquet for his help in MS analysis and Pr. M. Bensalah (Faculty of Life Sciences, Tlemcen University) for a travel grant.

### References

- N. Kilian, B. Gemeinholzer and H.W. Lack, *Cichorieae*. In *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. Edits., V.A. Funk, A. Susanna, T.F. Stuessy and R.J. Bayer, pp. 343–383, International Association for Plant Taxonomy, Vienna (2009).
- P. Quézel and S. Santa, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, p. 1047, Edition CNRS, Tome II, Paris (1963).
- J.A. Audissou, *Warionia Saharae*. *Br. Cactus Succulent J.*, **17**, 124–126 (1999).
- L. Katinas, M.C. Tellería, A. Susanna and S. Ortiz, *Warionia (Asteraceae): A relict genus of Cichorieae?* *Anales Jardín Botánico de Madrid*, **65**, 367–381 (2008).
- F. Hilmi, O. Sticher and J. Heilmann, *New cytotoxic 6,7-cis and 6,7-trans configurated guaianolides from Warionia saharae*. *J. Nat. Prod.*, **65**, 523–526 (2002).
- F. Hilmi, O. Sticher and J. Heilmann, *New cytotoxic sesquiterpene lactones from Warionia saharae*. *Planta Med.*, **69**, 462–464 (2003).
- A. Essaqui, A. Elamrani, M. Benaïssa, A.I. Rodrigues and L. Yoongho, *Chemical composition of the leaves extract of Warionia saharae of Morocco*. *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, **7**, 250–254 (2004).
- F. Hilmi, J. Gertsch, P. Bremner, S. Valovic, M. Heinrich, O. Sticher and J. Heilmann, *Cytotoxic versus anti-inflammatory effects in HeLa, Jurkat T and human peripheral blood cells caused by guaianolide-type sesquiterpene lactones*. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 3659–3663 (2003).
- F. Amezzouar, W. Badri, M. Hsaine, N. Bourhim and H. Fougrach, *Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of leaves essential oil and ethanolic extract of Moroccan Warionia saharae Benth. & Coss.* *J. Appl. Pharm. Sci.*, **2**, 212–217 (2012).
- J.L. Ramaut, M. Hofinger, R. Dimbi, M. Corvisier and J. Lewalle, *Main constituents of the essential oil of Warionia saharae Benth. & Coss.* *Chromatographia*, **20**, 193–194 (1985).
- A. Essaqui, A. Elamrani, J.A. Cayuela and M. Benaïssa, *Chemical composition of the essential oil of Warionia saharae from Morocco*. *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, **10**, 241–246 (2007).
- M. Znini, L. Majidi, A. Laghchimi, J. Paolini, B. Hammouti, J. Costa, A. Bouyanzer and S.S. Al-Deyab, *Chemical composition and anticorrosive activity of Warionia saharae essential oil against the corrosion of mild steel in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **6**, 5940–5955 (2011).
- K. Sellam, M. Ramchoun, C. Alem, F. Khallouki, B. El Moualij and L. El Rhaffari, *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Warionia saharae from oases of Morocco*. In *Gas Chromatography – Biochemicals, Narcotics and Essential Oils*. Edits. B. Salih and Ö. Çelikbıçak, pp. 213–220, InTech, Rijeka (2012).
- M. Znini, G. Cristofari, L. Majidi, A. El Harrak, J. Paolini and J. Costa, *In vitro antifungal activity and chemical composition of Warionia saharae essential oil against 3 apple phytopathogenic fungi*. *Food Sci. Biotechnol.*, **22**, 1–7 (2013).
- S. Mezhoud, S. Derbré, S. Ameddah, R. Mekkiou, O. Boumaza, R. Seghiri, S. Benayache, P. Richomme and F. Benayache, *Antioxidant activity and chemical constituents of Warionia saharae Benth. & Coss. (Compositae) from Algeria*. *Int. J. Med. Arom. Plants*, **2**, 509–513 (2012).
- N. Belboukhari, A. Cheriti, E. Bombarda, E. Gaydou, *Essential oil composition of the endemic medicinal plant Warionia saharae Benth. & Coss.* *PhytoChem. BioSub. J.*, **2**, 3 (2008).
- F.W. McLafferty and D.B. Stauffer, *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th edn. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM Version 3.10d. Palisade, Newfield (1994).
- National Institute of Standards and Technology, *PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database*. Perkin–Elmer Corp., Norwalk, CT (1999).
- W.A. König, D.H. Hochmuth and D. Joulain, *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils, Library of MassFinder 2.1*. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg (2001).
- R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th edn. Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL (2007).
- F. Tomi, P. Bradesi, A. Bighelli and J. Casanova, *Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy*. *J. Magn. Reson. Anal.*, **1**, 25–34 (1995).
- S. Rezzi, A. Bighelli, V. Castola and J. Casanova, *Direct identification and quantitative determination of acidic and neutral diterpenes using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy*. *J. Applied Spectrosc.*, **56**, 312–317 (2002).
- F. Tomi and J. Casanova, *<sup>13</sup>C NMR as a tool for identification of individual, components of essential oils from Labiatae*. *Acta Hort.*, **723**, 185–192 (2006).
- A. Bighelli and J. Casanova, *Analytical methods for Cymbopogon oils*. In *Essential Oil Bearing Grasses, The genus Cymbopogon*. Edit., A. Akhila. CRC Press, Boca Raton, FL (2009).
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), *Performance standards for antimicrobial disk*

- susceptibility test*, 6th edn. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA (1997).
26. S. Kordali, A. Cakir, A. Mavi, H. Kilic and A. Yildirim, *Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish Artemisia species*. J. Agric. Food Chem., **53**, 1408–1416 (2005).
  27. S. Kordali, R. Kotan and A. Cakir, *Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes in-vitro as plant disease control agents*. Allelopathy J., **19**, 373–392 (2007).
  28. M.C. Blanc, P. Bradesi, M.J. Gonçalves, L. Salgueiro and J. Casanova, *Essential oil of Dittrichia viscosa ssp. viscosa: Analysis by <sup>13</sup>C-NMR and antimicrobial activity*. Flavour. Fragr. J., **21**, 324–332 (2006).
  29. P. Fandohan, J.D. Gbenou, B. Gnonlonfin, K. Hell, W.F.O. Marasas and M.J. Wingfield, *Effect of essential oils on the growth of Fusarium verticillioides and fumonisin contamination in corn*. J. Agric. Food Chem., **52**, 6824–6829 (2004).
  30. Terpenoids Library Website. [http://massfinder.com/wiki/Terpenoids\\_Library](http://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library).

# Thymyl esters derivatives and a new natural product modhephanone from *Pulicaria mauritanica* Coss. (Asteraceae) root oil<sup>‡</sup>

Tao Xu,<sup>a†</sup> Mohammed Gherib,<sup>b†</sup> Chahrazed Bekhechi,<sup>b</sup> Fewzia Atik-Bekkara,<sup>b</sup> Hervé Casabianca,<sup>c</sup> Félix Tomi,<sup>a\*</sup> Joseph Casanova<sup>a</sup> and Ange Bighelli<sup>a</sup>

**ABSTRACT:** Root essential oil of *Pulicaria mauritanica* Coss. (Asteraceae) collected from western Algeria was analysed using a combination of chromatographic (CC, GC/FID, GC(RI)) and spectroscopic [GC-MS, <sup>13</sup>C-NMR] techniques. Thirty-eight compounds accounting for 90.4% of the whole composition were identified. The oil composition was dominated by thymyl derivatives (2,5-dimethoxy-*p*-cymene (37.2%), 6-methoxythymyl isobutyrate (14.2%), 10-isobutyryloxy-8,9-dehydrothymyl isobutyrate (4.8%) and thymyl isobutyrate (3.1%)), as well as by neryl isobutyrate (11.1%). A new natural compound was isolated and the structure was elucidated as 1S,2S,5S,8S-modhephan-3-one (relative stereochemistry). Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** *Pulicaria mauritanica*; root oil; thymol derivatives; structure elucidation; modhephanone

## Introduction

The *Pulicaria* genus (Asteraceae), which consists of 100 species, is well distributed from Europe to North Africa, particularly around the Mediterranean basin, as well as in Asia.<sup>[1]</sup> *Pulicaria mauritanica* Coss. is an endemic species of Morocco and Algeria. This herbaceous plant with a strong characteristic odour<sup>[2]</sup> is one of the 13 *Pulicaria* species growing wild in Algeria, and its botanical characters have been described in literature.<sup>[3]</sup> In the Nâama province (western Algeria), the local herbalists traditionally use this wild plant to treat inflammation-related diseases as well as for treatment of intestinal disorders and headache (by fumigation). In some Moroccan localities, it is also used as a herbal tea and to make various foods.

Recently, Liu *et al.*<sup>[4]</sup> reviewed the phytochemical data concerning the genus *Pulicaria* and a few of these studies concerned the chemical composition of *P. mauritanica* essential oil. Indeed, according to the recent literature<sup>[5]</sup> the occurrence of carvotanacetone as major component (81%) of essential oil isolated from aerial parts was mentioned as early as 1949 by Gatefossé and Igolen. A similar composition has been reported recently for Moroccan oils (four samples, mean content of carvotanacetone = 87.3%)<sup>[5,6]</sup> and Algerian oils (36 samples, content of carvotanacetone = 89.2–96.1%). The antimicrobial effect of the essential oil was evaluated against bacteria, yeast and filamentous fungi (lowest minimum inhibitory concentration (MIC) value = 2 µl/ml).<sup>[7]</sup> However, to our knowledge, no phytochemical investigations on *P. mauritanica* root essential oil have been undertaken to date. Thus in continuation of our work on the characterization of aromatic and medicinal plants of Africa, the present work concerns the chemical composition of *P. mauritanica* root essential oil.

## Experimental

### Chemicals

Isobutyryl chloride and trimethylamine were obtained from Sigma-Aldrich-Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France). For measurement of response factors (RFs), reference compounds (camphene, carvacrol, carvone, (*E*)-*b*-caryophyllene, caryophyllene oxide) were obtained in the highest available purity from Sigma-Aldrich-Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France). Carvacryl isobutyrate was obtained by synthesis and 6-methoxythymyl isobutyrate was purified by preparative thin-layer chromatography from fraction F3.3 (see later) obtained by column chromatography (CC).

### Plant Material

Roots of *P. mauritanica* were collected in April 2013 (Ain Ouarka, Nâama province, Western Algeria). Professor A. Marouf (University of Nâama, Algeria) identified plant material and a voucher specimen has been deposited at the Laboratory of Natural Products, (Department of Biology, University of Tlemcen, Algeria), under accession number A2778.

\* Correspondence to: F. Tomi, Université de Corse-CNRS, UMR CNRS 6134, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France. E-mail: felix.tomi@univ-corse.fr

† T. Xu and M. Gherib contributed equally to this work.

‡ This article is part of the virtual special issue of the Flavour and Fragrance Journal entitled "Essential oils: chemical analysis and biological properties" edited by Patrizia Rubiolo and Paula Dugo.

<sup>a</sup> Université de Corse-CNRS, UMR CNRS 6134, Equipe Chimie et Biomasse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

<sup>b</sup> Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie

<sup>c</sup> Institut des Sciences Analytiques, 5 Rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

## Essential Oil Isolation and Fractionation

Roots of *P. mauritanica* (3 × 350–400 g) were submitted to hydro-distillation using a Clevenger type apparatus for 3 h, and yielded a pale yellow oil (1.932 g in total). The essential oil (1.707 g) was chromatographed on silica gel (200–500 μm, 40 g) and six fractions were eluted with a gradient of solvents pentane/diethyl ether (P/DE) from 100:0 to 0:100. Fraction F1 (52 mg, eluted with P) contained hydrocarbons; fractions F2–F5 (701, 266, 233 and 165 mg, respectively, eluted with P:DE mixtures) contained medium polar compounds; fraction F6 (268 mg, eluted with DE) contained polar compounds. Fraction F3 was repeatedly fractionated with a mixture of pentane/ethyl acetate (P/EA) = 120:1 on silica gel (63–200 μm, 6 g) impregnated with 1.2 g of AgNO<sub>3</sub> (20% w/w). Three fractions F3.1–F3.3 (23, 178, and 67 mg respectively) were eluted. Fraction F3.2 was subjected to silica gel chromatography (63–200 μm, 4 g) using a gradient of solvents (P/DE) of increasing polarity as mobile phase and yielded subfractions F3.2a (17 mg) and F3.2b (23 mg). Fraction F5 was again fractionated with P/DE = 100:1 on silica gel (63–200 μm, 4 g) and yielded F5.1 and F5.2 (12 and 125 mg respectively). Fraction F6 was fractionated on silica gel (63–200 μm, 6 g) with P/DE = 90:10 to 0:100 and yielded F6.1–F6.4 (47, 69, 21 and 25 mg, respectively).

## Gas Chromatography with Flame Ionization Detection

Analyses were performed on a Clarus 500 Perkin Elmer (Courtaboeuf, France) chromatograph equipped with flame ionization detectors (FID) and two fused-silica capillary columns (50 m × 0.22 mm, film thickness 0.25 μm), BP-1 (polydimethyl siloxane) and BP-20 (polyethylene glycol). The oven temperature was programmed from 60 to 220°C at 2°C/min and then held isothermal at 220°C for 20 min; injector temperature, 250°C; detector temperature, 250°C; carrier gas, helium (0.8 mL/min); split, 1/60. Retention indices (RI) were determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation (Target Compounds software from Perkin Elmer).

## Gas Chromatography–Mass Spectrometry in Electron Impact Mode

Fractions F1–F6 obtained by CC were analysed with a Perkin-Elmer TurboMass detector (quadrupole), directly coupled to a Perkin-Elmer Autosystem XL (Courtaboeuf, France) equipped with a fused-silica capillary column (60 m × 0.22 mm i.d., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane). Carrier gas, helium at 1 mL/min; split, 1/80; injection volume, 0.2 μL; injector temperature, 250°C; oven temperature programmed from 60 to 230°C at 2°C/min and then held isothermal (45 min); ion source temperature, 150°C; energy ionization, 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired over the mass range 35–350 Da.

## Gas Chromatography–High-resolution Mass Spectrometry

Gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GC–TOF/MS) analyses were performed on an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to a TOF/MS GCT Premier from Waters equipped with a column (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm), DB-5MS UL; injection volume, 1 μL; mode, splitless; oven temperature programmed from 60°C (1 min) to 320°C (25°C/min), held at 320°C for 10 min. Transfer line temperature at 250°C and source temperature at 200°C. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode (energy ionisation, 70 eV). Multichannel plate voltage was set at 2600 V, acquisition rate at 10 spectra/s (i.e. 5 spectra/s with 'Dynamic Range Enhancement' mode on) and pusher interval at 40 μs. Acquisition was performed in the full-scan mode with a scan range of *m/z* 50–550. Calibration was undertaken using the Calibration Wizard, with heptacosane as the reference. The mass resolution was around 7000 full-width at half maximum for *m/z* 218.9856. During acquisitions, an

internal standard, pentafluorobromobenzene, was introduced continuously into the Electron Impact source, from a reference reservoir at 50°C and through a reference inlet at 120°C. The mass *m/z* 181.0077 was used as lock mass. Data were processed with MassLynx 4.1 (Waters).

## Nuclear Magnetic Resonance

All nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker AVANCE 400 (Wissembourg, France) (400.132 MHz for <sup>1</sup>H and 100.623 MHz for <sup>13</sup>C) equipped with a 5-mm probe, in deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>), with all shifts referred to internal tetramethylsilane (TMS). The <sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width (PW), 4.3 μs; relaxation delay 1 s and acquisition time 2.6 s for 32 K data table with a spectral width (SW) of 6000 Hz. The <sup>13</sup>C-NMR spectra were recorded with the following parameters: pulse width, 4 μs (flip angle 45°); acquisition time, 2.7 s for 128 K data table with a spectral width of 24 000 Hz (240 ppm); composite pulse decoupling (CPD) mode; digital resolution, 0.183 Hz/pt. Standard pulse sequences from Bruker library were used for two-dimensional spectra. Gradient-enhanced sequences were used for the heteronuclear two-dimensional experiments.

## Identification of Individual Components

Identification of the individual components was based on: (i) comparison of their GC RIs on apolar and polar columns, determined relative to the retention times of a series of *n*-alkanes with linear interpolation ('Target Compounds' software of Perkin-Elmer), with those of authentic compounds, or literature data; (ii) computer search using digital libraries of mass spectral data<sup>[8,9]</sup> and/or literature data<sup>[10,11]</sup>; (iii) <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, following a computerized method developed in our laboratory,<sup>[12–14]</sup> using a home-made software, by comparison of the chemical shift values of the signals in the essential oil spectrum with those of reference compounds compiled in a laboratory-built library. This method allows the identification of individual components of the essential oil at content as low as 0.3–0.4%. A few compounds were identified by comparison with literature data.

### Mass spectra of compounds 13, 15, 29, 31, 32, 33, 34

2,5-dimethoxy-*p*-cymene **13**: *m/z* (%), 194(45) [M<sup>+</sup>], 179(100), 164(41), 91(10); 8,9-dehydro-2,5-dimethoxy-*p*-cymene **15**: *m/z* (%), 192(90) [M<sup>+</sup>], 177(100), 162(31), 91(30); modhephan-3-one **29**: HRMS 220.1831 (98) [M<sup>+</sup>], 149.1327(49), 121.1004(100), 93.0686(31); 6-methoxythymyl isobutyrate **31**: *m/z* (%), 248(10) [M<sup>+</sup>], 178(100), 180(18), 163(31), 91(10), 43(50); 6-methoxy-8,9-dehydrothymyl isobutyrate **32**: *m/z* (%), 250(10) [M<sup>+</sup>], 180(100), 165(57), 91(8), 43(50); 10-isobutyryloxy thymyl isobutyrate **33**: *m/z* (%), 306(3) [M<sup>+</sup>], 236(7), 218(27), 175(9), 148(100), 135(35), 133(32), 105(11), 91(13), 71(40); 10-isobutyryloxy-8,9-dehydrothymyl isobutyrate **34**: *m/z* (%), 304(6) [M<sup>+</sup>], 234(10), 216(7), 146(100), 145(39), 115(9), 105(11), 91(10), 71(38).

## Quantification of Components

The relative amounts of volatile components, expressed as percentages, were obtained by FID peak-area normalization by calculating the response factors (RFs)<sup>[15,16]</sup> of FID for different classes of volatiles (monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes, oxygenated *p*-cymene derivatives) occurring in the essential oil. Owing to the large number of compounds present and the non-availability of commercial standards for many of them, compounds identified from essential oils (EOs) of each class were assumed to have the same quantitative GC response factors. The RFs of reference compounds and the components of the EO to which they have been applied are reported in Table 1. The RFs were calculated using the formula:

Table 1. Calculated response factors (RFs) for reference compounds		
Compounds	RF <sup>a</sup>	RF applied to components
Camphene, <i>p</i> -cymene	0.93	<b>1–4</b>
( <i>E</i> )- $\beta$ -Caryophyllene	1.07	<b>8, 10–12, 14, 16–18, 22, 24–25</b>
Carvacrol	1.23	<b>7, 13, 15,</b>
Caryophyllene oxide	1.32	<b>28–30</b>
Carvone	1.38	<b>5</b>
Geranyl acetate	1.46	<b>6, 9, 21</b>
Carvacryl isobutyrate	1.46	<b>19–20, 23, 26–27,</b>
6-Methoxythymyl isobutyrate	1.46	<b>31–37</b>

<sup>a</sup>RFs were determined against nonane.

$$RF = (C_{\text{analyte}}/C_{\text{is}}) \times (A_{\text{is}}/A_{\text{analyte}})$$

where  $C_{\text{analyte}}$  and  $A_{\text{analyte}}$  are the concentration and the absolute peak area of the standard compound, and  $C_{\text{is}}$  and  $A_{\text{is}}$  are the concentration and the absolute peak area of nonane (internal standard). Component **38**, 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol, was not eluted on GC in our analytical conditions. According to the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum, **38** was a unique component of fraction F6.4, therefore its content has been calculated taking into account the ratio of the mass of F6.4 versus the mass of the chromatographed EO.

### Synthesis of Carvacryl Isobutyrate

Isobutyryl chloride (403 mg, 3.8 mmols) was added dropwise at 0°C to a mixture of carvacrol (578 mg, 3.8 mmols) and trimethylamine (535 mg, 9.1 mmols) in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h, at 60°C for 3 h and then quenched with water and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  25 mL). Finally, the combined organic layer was washed with water and dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$  over night. After removal of the solvent in vacuum, the residue was purified by CC using silica gel (63–200  $\mu\text{m}$ ) with P/DE=90:10 as eluent to afford pure (98.9%)

carvacryl isobutyrate (147 mg, 0.7 mmol, yield 18%), retention indices  $\text{RI}^{\text{a}}$ ,  $\text{RI}^{\text{p}}$  = 1489, 1935.  $^1\text{H}$ -NMR (d, ppm vs. TMS; J, Hz) = 7.18 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.04 (d,  $J$  = 7.5 Hz, Ar-H), 6.88 (s, 1H, Ar-H), 2.83–2.93 (m, 2H, CH), 2.16 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.37 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ) 1.25 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ),  $^{13}\text{C}$ -NMR (d, ppm vs. TMS): 175.3, 149.3, 148.0, 130.9, 127.2, 124.0, 119.8, 34.2, 33.6, 23.9, 19.1, 15.8); the NMR data are in agreement with those reported.<sup>[17]</sup>

## Results and Discussion

### Chemical Composition of *P. mauritanica* Root Oil

When subjected to hydrodistillation, roots of *P. mauritanica* Coss. (Asteraceae) furnished a pleasant fruity pale yellow essential oil (yield=0.17% w/w vs. dry material, mean value). The essential oil has been analysed by GC/FID in combination with retention indices on two columns of different polarity (Figure 1), by GC–MS with the apolar column and by  $^{13}\text{C}$ -NMR following a computerized method developed in our laboratory.<sup>[12–14]</sup> Fourteen components have been identified directly from the essential oil (Table 2). Among the components identified, compounds present in medium to high contents have been identified by the three techniques. They belong to various families of compounds, particularly oxygenated *p*-cymene derivatives (Figure 2; 2,5-dimethoxy-*p*-cymene **13** (37.2%), 8,9-dehydrothymyl isobutyrate **19** (1.7%), thymyl isobutyrate **20** (3.1%)) and oxygenated monoterpenes (bornyl acetate **6** (1.1%) and neryl isobutyrate **21** (11.1%)). Two sesquiterpene hydrocarbons were also identified: modephene **11** (0.8%) and  $\beta$ -isocomenene **14** (1.2%). Other minor components have been identified by GC(RI) and by GC–MS: carvotanacetone **5** (0.1%), silphin-1-ene **10** (0.1%),  $\alpha$ -isocomenene **12** (0.4%), (*E*)-*b*-caryophyllene **16** (0.2%),  $\beta$ -sesquiphellandrene **25** (0.2%), caryophyllene oxide **28** (0.2%) and  $\tau$ -cadinol **30** (trace).

As several compounds remained unidentified, *P. mauritanica* root oil was fractionated by silica-gel CC using a gradient of solvents. Non-polar components (fraction F1), medium polar components (fractions F2–F4) and polar compounds (fractions

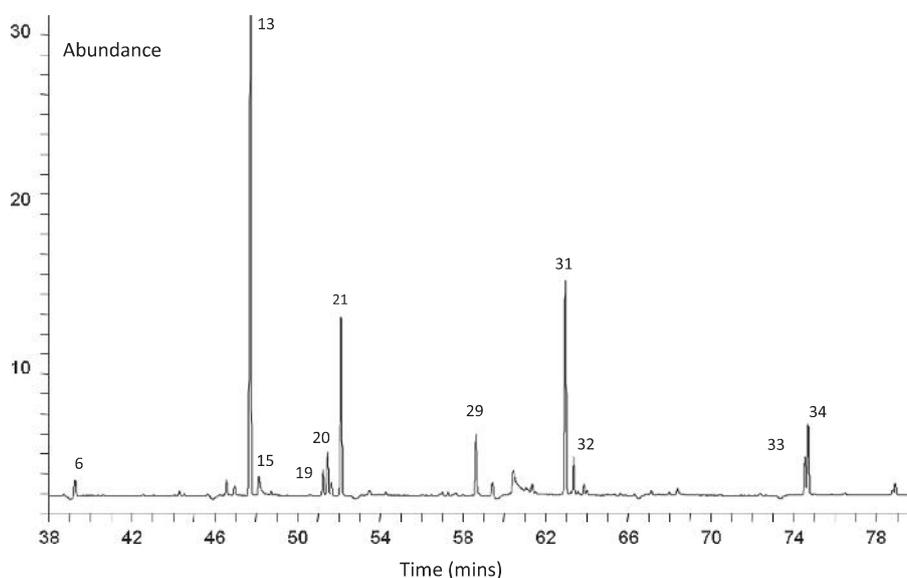


Figure 1. The GC/FID chromatographic profile of *Pulicaria mauritanica* root oil on an apolar column (BP-1)

**Table 2.** Components of *Pulicaria mauritanica* root oil

Compounds <sup>a</sup>	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	RI <sup>d</sup>	RF	g/100 g	Identification
<b>1</b> Camphene	950	943	1072	0.93	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>2</b> Myrcene	987	980	1160	0.93	tr	RI, MS
<b>3</b> <i>p</i> -Cymene	1015	1012	1273	0.93	tr	RI, MS
<b>4</b> ( <i>Z</i> )-β-ocimene	1029	1023	1230	0.93	tr	RI, MS
<b>5</b> Carvotanacetone	1220	1221	1677	1.38	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>6</b> Bornyl acetate	1270	1270	1578	1.46	1.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>7</b> Carvacrol	1278	1275	2204	1.23	tr	RI, MS
<b>8</b> 7α-H-silphiperfol-5-ene	1329	1328	1425	1.07	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>9</b> Neryl acetate	1342	1347	1725	1.45	0.2	RI, MS
<b>10</b> Silphin-1-ene	1350	1350	1471	1.07	0.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>11</b> Modhephene	1383	1382	1522	1.07	0.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>12</b> α-Isocomene	1389	1388	1534	1.07	0.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>13</b> 2,5-Dimethoxy- <i>p</i> -cymene	1399	1400	1866	1.23	37.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>14</b> β-Isocomene	1411	1407	1567	1.07	1.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>15</b> 8,9-Dehydro-2,5-dimethoxy- <i>p</i> -cymene	1420	1416	1960	1.23	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>16</b> ( <i>E</i> )-β-Caryophyllene	1421	1419	1471	1.07	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>17</b> ( <i>E</i> )-β-Farnesene	1446	1450	1583	1.07	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>18</b> α-Humulene	1455	1452	1668	1.07	tr	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>19</b> 8,9-Dehydrothymyl isobutyrate	1458	1455	1933	1.46	1.7	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>20</b> Thymyl isobutyrate	1462	1461	1896	1.46	3.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>21</b> Neryl isobutyrate	1468	1471	1776	1.46	11.1	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>22</b> γ-Murolene	1474	1477	1684	1.07	tr	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>23</b> Carvacryl isobutyrate	1489	1487	1935	1.46	0.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>24</b> β-Bisabolene	1503	1507	1719	1.07	tr	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>25</b> β-Sesquiphellandrene	1516	1515	1771	1.07	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>26</b> 8,9-Dehydrothymyl 2-methylbutyrate	1548	1550	2003	1.46	tr	RI, MS
<b>27</b> Thymyl 2-methylbutyrate	1551	1551	1807	1.46	tr	RI, MS
<b>28</b> Caryophyllene oxide	1578	1565	1976	1.32	0.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>29</b> Modhephan-3-one	-	1582	2005	1.32	4.1	TOF-MS, <sup>1</sup> D, 2D NMR
<b>30</b> τ-Cadinol	1633	1624	2163	1.32	tr	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>31</b> 6-Methoxythymyl isobutyrate	1658	1659	2262	1.46	14.2	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>32</b> 6-Methoxy-8,9-dehydrothymyl isobutyrate	1676	1666	2259	1.46	2.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>33</b> 10-Isobutyryloxy thymyl isobutyrate	1891	1880	2479	1.46	2.6	RI, MS
<b>34</b> 10-Isobutyryloxy-8,9-dehydrothymyl isobutyrate	1891	1883	2519	1.46	4.8	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>35</b> 10-(2-Methylbutyryloxy)-8,9-dehydrothymyl isobutyrate	1970	1967	2601	1.46	0.4	RI, MS, <sup>13</sup> C-NMR
<b>36</b> 10-Isobutyryloxy-8,9-epoxythymyl isobutyrate	-	1986	2759	1.46	0.8	RI, <sup>13</sup> C-NMR
<b>37</b> 10-(2-Methylbutyloxy)-8,9-epoxythymyl isobutyrate	-	2056	-	1.46	1.0	RI, <sup>13</sup> C-NMR
<b>38</b> 8-Hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol <sup>e</sup>	-	-	-	-	1.5 <sup>e</sup>	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-NMR
Monoterpene hydrocarbons,					0.1	
Oxygenated monoterpenes					12.5	
Thymyl and carvacryl derivatives					70.3	
Sesquiterpene hydrocarbons					3.2	
Oxygenated sesquiterpenes					4.3	
Total identified					90.4	

RI, retention indices; RF, response factor; tr, traces less than 0.05%; <sup>13</sup>C-NMR, components were identified by NMR in the essential oil (EO) and obvious in at least in one fraction of chromatography; <sup>13</sup>C-NMR, components were identified by NMR in one fraction of chromatography.

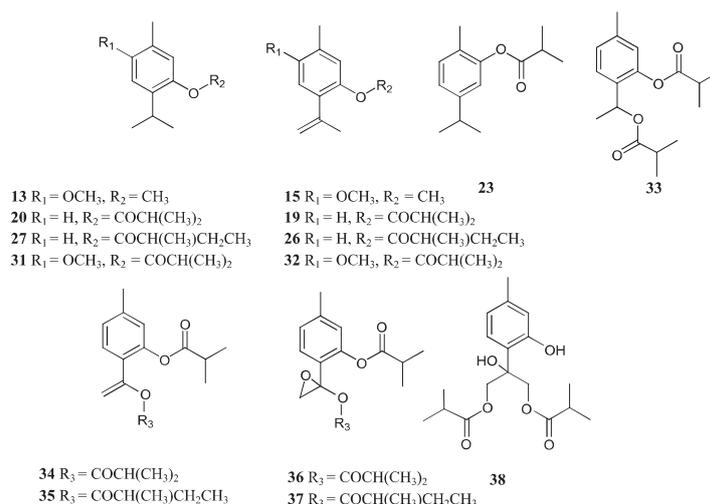
<sup>a</sup>Order of elution and percentages were given on an apolar column (BP1). Compound **29** was found for the first time in nature. The RI for compounds **29** and **36–38** not found in the literature.

<sup>b</sup>Retention indices reported in Terpenoids Library Website<sup>[29]</sup> for monoterpenes and sesquiterpenes, for thymyl and carvacryl derivatives (see text).

<sup>c</sup>Retention indices measured on BP1 capillary column.

<sup>d</sup>Retention indices measured on BP20 capillary column.

<sup>e</sup>According to NMR spectra, fraction F6.4 of the CC contained only compound **38**, which is not eluted on the GC. Therefore, the content of **38** (g/100 g) was calculated taking into account the mass of fraction F6.4 versus the mass of the EO.



**Figure 2.** Identified oxygenated *p*-cymene derivatives from *Pulicaria mauritanica* root oil

F5 and F6) were first separated. Fractions F3, F5 and F6 were then fractionated once again in order to obtain compounds with a degree of purity, sufficiently high to allow for the elucidation of their structures. Fractions F1–F6 of the CC were analysed using GC/FID, GC–MS and <sup>13</sup>C-NMR. Obviously, all the components previously found in the essential oil were again identified in the fractions of the CC. Moreover, the presence of various minor components previously identified by MS in the EO was confirmed by <sup>13</sup>C-NMR: silphin-1-ene **10** (10.3%, F1),  $\alpha$ -isocomene **12** (9.3%, F1), (*E*)- $\beta$ -caryophyllene **16** (10.2%, F1),  $\beta$ -sesquiphellandrene **25** (9.0%, F1) as well as carvotanacetone **5** (2.7%, F5), caryophyllene oxide **28** (4.1%, F5) and  $\tau$ -cadinol **30** (5.0% in F6.3). Identification of other components was achieved by analysis of the CC and they are reported family by family of compounds: hydrocarbons, oxygenated *p*-cymene derivatives and oxygenated terpenes.

### Hydrocarbons

Various hydrocarbons present but not ascertained in the EO were identified in the F1 fraction of the CC, either by GC(RI) and GC–MS (myrcene **2** (trace), *p*-cymene **3** (trace), (*Z*)- $\beta$ -ocimene **4** (tr)) or by GC(RI), GC–MS and <sup>13</sup>C-NMR (camphene **1** (0.6%), 7 $\alpha$ -H-silphiperfol-5-ene **8** (1.6%),  $\alpha$ -humulene **18** (0.4%), and (*E*)- $\beta$ -farnesene **17** (3.2%),  $\gamma$ -muurolene **22** (0.8%), and  $\beta$ -bisabolene **24** (0.6%).

### Oxygenated *p*-Cymene Derivatives

Concerning oxygenated *p*-cymene derivatives, various strategies have been used, depending of the content of each component and the published data. As previously mentioned, 2,5-dimethoxy-*p*-cymene **13** (37.2%), 8,9-dehydrothymyl isobutyrate **19** (1.7%) and thymyl isobutyrate **20** (3.1%) were identified in the EO by GC(RI), GC–MS and <sup>13</sup>C-NMR. Their presence was confirmed in the fractions of the CC. Otherwise, examination of the <sup>13</sup>C-NMR spectra of the CC fractions demonstrated that various unidentified components probably bore the *p*-cymene skeleton, with one or more oxygenated functions (thymol or carvacrol derivatives). At this stage, we should remember that identification of individual components by <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy is achieved by computer

matching against two spectral data libraries, the first one constructed with spectra recorded in our laboratory, the second one constructed in the laboratory with NMR data reported in the literature. However, both libraries contained only a few data for thymol and carvacrol derivatives. Therefore, we enlarged the second library with NMR data of oxygenated *p*-cymene derivatives taken from the literature. Computer matching against that library permitted the identification of the following components:

- 8,9-dehydro-2,5-dimethoxy-*p*-cymene **15** (1.2% in fraction F2) was identified by comparison of its RIs, MS data and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts with those reported in the literature;<sup>[18,19]</sup>
- the structure of 6-methoxythymyl isobutyrate **31** (58.3% in F5.1) was easily deduced from the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra of that fraction when compared with those of methylcarvacrol and thymyl isobutyrate. The <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data fitted perfectly with those reported by Zee *et al.*,<sup>[20]</sup>
- 10-isobutyryloxy-8,9-dehydrothymyl isobutyrate **34** (79.8% in F5.3) and 10-(2-methylbutyryloxy)-8,9-dehydrothymyl isobutyrate **35** (21.0% in F6.3) were identified by comparison with the <sup>13</sup>C-NMR data reported by Weremczuk-Jezyna *et al.*, who isolated these compounds from the root oil of *Arnica montana*,<sup>[21]</sup>
- 10-isobutyryloxy-8,9-epoxythymyl isobutyrate **36** (81.7% in F6) and 10-(2-methylbutyloxy) 8,9-epoxythymyl isobutyrate **37** (45.1% in F6.3) were identified by comparison of their <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts with those reported by Zee *et al.*,<sup>[20]</sup> who isolated these two compounds from *Carpesium divaricatum* essential oil;
- 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol **38**. This highly oxygenated compound is not sufficiently volatile and consequently was not eluted by the GC under our analytical conditions. Therefore, it could not be detected and identified using GC–MS. However, this compound was identified in the fraction F6.4 eluted with diethyl oxide, by comparison of its chemical shifts with those reported by Zhang *et al.*, who isolated the compound from the ethanol extract of *Inula hupehensis*.<sup>[22]</sup>

In addition:

- carvacrol **7**, present at trace level in the EO, was identified by GC(RI) and GC–MS in fraction F6.3 (0.2%);

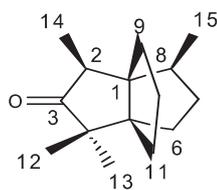
- the structure of carvacryl isobutyrate **23** (0.8% in F2) was suggested by combination of MS data and retention indices values, and was confirmed by comparison of its  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts with those of the genuine compound obtained by esterification of carvacrol (see Experimental);
- 8,9-dehydrothymyl-2-methylbutyrate **26** (0.2% in F3) and thymyl 2-methylbutyrate **27** (0.5% in F3) were identified by computer matching against mass spectral libraries and by comparing their RIs with those reported in the literature:<sup>[9,23]</sup>
- 6-methoxy-8,9-dehydrothymyl isobutyrate **32** (13.8% in F4) differed from **31** only by the presence of the C8–C9 double bond. Both compounds exhibited very close mass spectral patterns with characteristic peaks at 248(10) [ $\text{M}^+$ ], 178(100), 163(31) versus 250(10) [ $\text{M}^+$ ], 180(100), 165(57), in agreement with literature<sup>[21]</sup> – the structure of **32** was confirmed by comparison of its  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts, picked up on the spectra of fraction F4, with those of **31** reported by Zee et al.,<sup>[20]</sup>
- 10-isobutyryloxy thymyl isobutyrate **33** (6.5% in F5.2) differed from **34** only by the lack of the C8–C9 double bond. As above, both compounds exhibited very close mass spectral patterns with characteristic peaks at 306(3) [ $\text{M}^+$ ], 236(7), 218(27), 148(100) versus 304(6), 234(10), 216(7), 146(100). The MS data were in agreement with the literature.<sup>[21]</sup>

### Oxygenated Terpenes – Structural Elucidation of Modhephan-3-one **29**

In addition to carvotanacetone **5**, bornyl acetate **6**, neryl isobutyrate **21**, caryophyllene oxide **28** and  $\tau$ -cadinol **30**, previously mentioned, neryl acetate **9** has been identified by GC(RI) and GC–MS in fraction F2 (0.2%). However, compound **29** (4.1% of the EO, 21.2% in F3 fraction) could not be identified by GC–MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR analysis, even by using all the computerized commercial MS libraries at our disposal as well as our laboratory-built  $^{13}\text{C}$ -NMR data library. Repeated chromatographic separation of the F3 fraction produced subfraction F3.2b containing high amount of the unknown component (80%) (RIs = 1580/2004 on apolar and polar columns respectively). Thus subfraction F3.2b was submitted to a full set of one and two-dimensional NMR experiments (Table 3).

The formula  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$  was deduced from the high-resolution mass spectrum ( $m/z = 220.1831$ , calculated = 220.1827), in agreement with the distortionless enhancement by polarization transfer spectra (4 methyls, 5 methylenes, 2 methines and 4 quaternary carbons). The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum confirmed a sesquiterpene structure bearing a ketone moiety (224.5 ppm) and characterized by the lack of double bond. The occurrence of a tricyclic structure could be easily deduced from these data. Little

**Table 3.** The NMR data of modhephan-3-one **29**



C	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	DEPT	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	H	Multiplicity (J, Hz)	HMBC	COSY
1	59.7	C					
2	49.7	CH	2.50		q (7.1)	1, 3, 9, 14	14
3	224.5	C					
4	49.1	C					
5	61.9	C					
6	25.7	CH <sub>2</sub>	1.48	a	m		
			0.95	b		4	
7	39.1	CH <sub>2</sub>	1.81	a		5	6, 8
			1.25	b			
8	49.6	CH	1.84		m		6, 7
9	29.1	CH <sub>2</sub>	1.50	a	m	2	
			1.36	b		1, 8	
10	34.5	CH <sub>2</sub>	1.79	a	m	5	9, 11
			1.48	b			
11	32.7	CH <sub>2</sub>	1.90	a	m	4, 5	10
			1.40	b			
12	20.6	CH <sub>3</sub>	0.98		Broad s	3, 4, 5, 13	
13	28.1	CH <sub>3</sub>	1.08		Broad s	3, 4, 5, 12	
14	10.6	CH <sub>3</sub>	1.01		d (7.1)	1, 2, 3, 10	2
15	15.1	CH <sub>3</sub>	1.03		d (6.6)	1, 8, 10	8

DEPT, distortionless enhancement by polarization transfer; HMBC, heteronuclear multiple bond correlation; COSY, correlation spectroscopy.

information was brought by the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum, however, it was noted that the signals of two methyls were doublets, whereas those of the two other methyls were singlets. A quartet at 2.50 ppm (linked to the methine carbon at 49.7 ppm) belongs to a proton probably  $\alpha$ -positioned to the carbonyl group. In addition, no cyclopropanic hydrogen was observed. From the long-range proton-carbon correlations (heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) spectrum) and characteristic chemical shifts, it appears that three (out of four) methyls (two singlets and a doublet) are located in a position with respect to the carbonyl group. They are also correlated with two quaternary carbons. All these findings suggest the occurrence of a five-membered ring bearing a carbonyl function with three methyls in  $\alpha$  position and linked with two other rings. A survey of the sesquiterpenes skeletons usually found among the volatile components of essential oils directed us towards the tricyclo[3.3.3.0 $^{1,5}$ ] undecane skeleton. Therefore, taking into account all the long-range proton-carbon correlations (Table 3), our molecule is probably one of the four 2,4,4,8-tetramethyltricyclo[3.3.3.0 $^{1,5}$ ] undecan-3-one diastereoisomers. Our hypothesis was confirmed by comparison with literature data, this compound being reported as an intermediate in the total synthesis of modhephene.<sup>[24]</sup> Unfortunately,  $^{13}\text{C-NMR}$  data are reported for the mixture of the four diastereoisomers.

The structure of the molecule being ensured, the next step consisted of taking advantage of the presence of a unique diastereoisomer. The precise stereochemistry of the two non-geminated methyl groups was confirmed by the observation of spatial correlation between H2 (2.50 ppm) and H8 (1.84 ppm) in the nuclear Overhauser effect spectroscopy spectrum. Therefore, the stereochemistry of compound **29** was deduced from the  $^{13}\text{C}$  chemical shift of methyl groups. First, the chemical shifts of C12 and C13 were assigned taking in consideration the shielding of C12 (-7.5 ppm) due to the  $\gamma$ -steric effect from C11. Then, it was noticeable that the signal of carbon C9 is shielded by 3.6 ppm with respect to the symmetrical carbon C11. Considering that the  $\gamma$  effect is responsible for the shielding, and that carbon C11 is under  $\gamma$ -steric influence of C12, carbon C9 should be under  $\gamma$ -steric influence of two methyls (C14 and C15). Therefore, methyls C14 and C15 are on the same side of the molecule as the third five-membered ring containing C9 and C11. Moreover, the chemical shift of C15 (15.1 ppm) fitted with that of modhephene (15.6 ppm) and differed from that of epimodhephene (16.73 ppm).<sup>[25]</sup> So compound **29** was finally identified as 1S,2S,5S,8S-modhephan-3-one (relative stereochemistry of the asymmetric carbon atoms).

## Conclusion

Combined analysis by chromatographic [CC, GC(RI)] and spectroscopic techniques (GC-MS,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) of *P. mauritanica* root oil allowed the identification of 38 components that accounted for 90.4% of its whole composition. The EO composition was mainly dominated by oxygenated *p*-cymene derivatives, 2,5-dimethoxy-*p*-cymene **13** (37.2%), 6-methoxythymyl isobutyrate **31** (14.2%) and thymyl isobutyrate **20** (3.1%), as well as neryl isobutyrate **21** (11.1%) and modhephan-3-one **29** (4.1%). This tricyclic sesquiterpene ketone, the structure of which has been elucidated using two-dimensional NMR spectroscopy, is reported for the first time as a natural compound.

The chemical composition of *P. mauritanica* root oil exhibited similarities with those of the EOs isolated from other Asteraceae

species, also characterized by the pre-eminence of thymol and carvacrol derivatives associated with sesquiterpenes bearing the tricyclo[3.3.3.0 $^{1,5}$ ]undecane skeleton of modhephane: *Arnica montana*,<sup>[21]</sup> *Doronicum corsicum*,<sup>[26]</sup> *Eupatorium cannabinum*,<sup>[23]</sup> *Eupatorium fortune*<sup>[27]</sup> or *Telekia speciosa*.<sup>[28]</sup> From the analytical point of view, identification of individual components of *P. mauritanica* root oil led us to highlight two points. The first one consisted in the identification of polyoxygenated thymol (or carvacrol) derivatives, which possessed various methoxy and ester functions located in different positions of the *p*-cymene structure. The second one is related to the structural elucidation of one of the four modhephanone stereoisomers, accounting for more than 4% of the oil composition and reported for the first time as a natural compound. In both cases, NMR played a crucial role, as well as in the identification of 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxy thymol, a tetrasubstituted *p*-cymene derivative that was not eluted by the GC.

## Acknowledgements

This work has been done within the cooperative programme between the Universities of Abou Bekr Belkaïd (Tlemcen) and Pascal Paoli (Corsica). The authors gratefully acknowledge Professor M. Bensalah (Dean, Faculty of Life Sciences) for attribution of a travel grant, Professor A. Marouf (University of Nâama) for his help with the plant identification, and Mr J.M. Desjobert (CPN laboratory, University of Corsica) who recorded the mass spectra.

## References

1. C. A. Williams, J. B. Harborne, J. R. Greenham, R. J. Grayer, G. C. Kite, J. Eagles. *Phytochem.* **2003**, *64*, 275.
2. J. Francisco-Ortega, S. J. Park, A. Santos-Guerra, A. Benabid, R. K. Jansen. *Biol. J. Linn. Soc.* **2001**, *72*, 77.
3. P. Quézel, S. Santa. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. CNRS Edition, Tome II: Paris, **1963**; 945.
4. L. L. Liu, J. L. Yang, S. P. Yan. *Chem. Biodiv.* **2010**, *7*, 327.
5. G. Cristofari, M. Znini, L. Majidi, A. Bouyanzer, S. S. Al-Deyab, J. Paolini, B. Hammouti, J. Costa. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2011**, *6*, 6699.
6. M. Znini, G. Cristofari, L. Majidi, J. Paolini, J.-M. Desjobert, J. Costa. *Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 564.
7. M. Gherib, C. Bekhechi, F. Atik Bekkara, A. Bighelli, J. Casanova, F. Tomi. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* **2014**, In press. ID: 886966 DOI: 10.1080/0972060X.2014.886966
8. National Institute of Standards and Technology. *PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library*. Perkin-Elmer Corporation: Norwalk, CT, **1999**.
9. W. A. König, D. H. Hochmuth, D. Joulain. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1*. Institute of Organic Chemistry: Hamburg, **2001**.
10. D. Joulain, W. A. König. *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*. E B-Verlag: Hamburg, **1998**.
11. R. P. Adams. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th edn.. Allured: Carol Stream, IL, **2007**.
12. F. Tomi, P. Bradesi, A. Bighelli, J. Casanova. *J. Magn. Reson. Anal.* **1995**, *1*, 25.
13. A. Bighelli, J. Casanova. In *Essential Oil-Bearing Grasses, The Genus Cymbopogon*, A. Akhila (ed). CRC Press: Boca Raton, FL, **2010**; 195.
14. F. Tomi, J. Casanova. *Acta Horticulturae* **2006**, *723*, 185.
15. C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. d'Acampora Zellner, R. Costa, P. Rubiolo. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 382.
16. R. Costa, B. d'Acampora Zellner, M. L. Crupi, M. R. De Fina, M. R. Valentino, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 40.
17. C. S. Mathella, K. K. Singh, V. K. Gupta. *Acta Pol. Pharm.* **2010**, *67*, 375.
18. S. Serra. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 619.
19. S. Andreani, M.-C. De Cian, J. Paolini, J.-M. Desjobert, J. Costa, A. Muselli. *Chem. Biodiv.* **2013**, *10*, 2061.
20. O. P. Zee, D. K. Kim, K. R. Lee. *Archives Pharm. Res.* **1998**, *21*, 618.

21. I. Weremczuk-Jezyna, H. Wyoskiska, D. Kalemba. *J. Essent. Oil Res.* **2011**, *23*, 91.
22. F. Zhang, J.-J. Qin, X.-R. Cheng, H. Jin, W.-D. Zhang. *Nat. Prod. Res. Dev.* **2012**, *24*, 427.
23. J. Paolini, J. Costa, A.-F. Bernardini. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1076*, 170.
24. D. P. Curran, W. Shen. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 755.
25. L. Fitzer, M. Majewski, H. Monzo-Oltra. *Tetrahedron* **1995**, *32*, 8835.
26. J. Paolini, A. Muselli, A.-F. Bernardini, A. Bighelli, J. Casanova, J. Costa. *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22*, 479.
27. M. Tori, Y. Ohara, K. Nakashima, M. Sono. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1048.
28. A. Wajs-Bonikowska, A. Stojakowska, D. Kalemba. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 625.
29. Terpenoids Library Website. [http://massfinder.com/wiki/Terpenoids Library](http://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library). [October 2013]

## Résumé

Les travaux présentés dans ce mémoire contribuent à l'étude phytochimique de deux espèces médicinales, utilisées dans la pharmacopée traditionnelle Algérienne. L'objectif de notre étude était, d'une part, de contribuer à la caractérisation par CPG (Ir), CC, CPG/SM et RMN du  $^{13}\text{C}$  de la composition chimique des huiles essentielles obtenues à partir de deux espèces : *Warionia saharae* Benth. & Hook. et *Pulicaria mauritanica* Coss., poussant à l'état spontané dans la région de Nâama (ouest de l'Algérie), et d'autre part, de contribuer à l'étude du pouvoir antimicrobien de ces huiles essentielles vis-à-vis des souches de référence.

L'huile essentielle de *Warionia saharae* est riche en sesquiterpènes oxygénés (53,6%), suivis par les monoterpènes oxygénés (22,7%). Les composants majoritaires sont : (*E*)-nérolidol (25,7%), -eudesmol (25,0%) et linalol (17,1%). L'analyse de 16 échantillons d'huile essentielle de *Warionia saharae* associée à un traitement statistique des données a permis de mettre en évidence une variabilité chimique intraspécifique. Ainsi, les échantillons se répartissent en deux groupes selon les teneurs des composés suivants : -eudesmol (17,6-32,9%), (*E*)-nérolidol (15,8-30,4%) et linalol (15,3-32,1%).

L'huile essentielle des parties aériennes de *Pulicaria mauritanica* est riche en monoterpènes oxygénés dont un composé nettement majoritaire, la carvotanacétone qui représente 89,2%.

La composition chimique de l'huile essentielle des racines de *P. mauritanica* est principalement dominée par les dérivés oxygénés du *p*-cymène : soient : le 2,5-diméthoxy-*p*-cymène (37,2 g/100g), l'isobutyrate de 6-méthoxythymyle (14,2 g/100g), l'isobutyrate de néryle (11,1 g/100g), l'isobutyrate de thymyle (3,1 g/100g) et la **modhéphhan-3-one** (4,1 g/100g). Cette cétone sesquiterpénique tricyclique dont la structure a été élucidée en utilisant la spectroscopie RMN à deux dimensions, est signalée pour la première fois en tant que composé naturel.

L'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles de *P. mauritanica* des parties aériennes et des racines montre une homogénéité et une stabilité de la composition chimique.

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique des huiles essentielles de ces deux plantes a été menée en déterminant le paramètre (CMI). Ainsi, l'huile essentielle des parties aériennes *P. mauritanica* est la plus active. Les souches microbiennes les plus sensibles sont : *Citrobacter freundii* et *Candida albicans* qui sont inhibées à des CMIs faibles de l'ordre de 2  $\mu\text{l/ml}$ . De même, les moisissures se sont montrées sensibles, inhibées à CMIs variant entre 2 et 3  $\mu\text{l/ml}$ .

**Mots clés :** *Warionia saharae* Benth. & Hook., *Pulicaria mauritanica* Coss., CPG (Ir), CPG/SM et RMN du  $^{13}\text{C}$ , pouvoir antimicrobien, CMI.

## Abstract

The work presented in this memory contributes under investigation phytochemic of two medicinal species used in the Algerian traditional pharmacopeia. The objective of our study was, on the one hand, to contribute to the characterization by CG(Ir), CG/SM and NMR of the  $^{13}\text{C}$  of the chemical composition of the essential oil obtained from two species: *Warionia saharae* Benth. & Hook. and *Pulicaria mauritanica* Coss., growing in a spontaneous state in the region of Nâama (western of Algeria), and in addition, to contribute under investigation of the antimicrobial activity of the essential oil against the reference strains.

The essential oil of *W. saharae* is rich in oxygenated sesquiterpenes (53.6%), followed by oxygenated monoterpenes (22.7%). The majority components are: (*E*)-nerolidol (25.7%), -eudesmol (25.0%) and linalool (17.1%). Analysis of 16 essential oil samples of *W. saharae* associated with a statistical treatment of data samples allowed to identify intraspecific chemical variability. Thus, the samples are divided into two groups according to the contents of the following compounds: -eudesmol (17.6-32.9%), (*E*)-nerolidol (15.8-30.4%) and linalool (15.3-32.1%).

The essential oil of the aerial parts of *P. mauritanica* is rich in oxygenated monoterpenes, which a compound extensively dominated, the carvotanacetone that accounts for 89.2%.

The chemical composition of the essential oil of the roots of *P. mauritanica* is mainly dominated by the oxygenated derivatives of *p*-cymene are: 2,5-dimethoxy-*p*-cymene (37.2 g/100g), 6-methoxythymyl isobutyrate (14.2 g/100g), neryl isobutyrate (11.1 g/100g), thymyl isobutyrate (3.1 g/100g) and modhephan-3-one (4.1 g/100g). This tricyclic sesquiterpene ketone whose structure has been elucidated using NMR spectroscopy to two dimensions, is shown for the first time as a natural compound. The study of the chemical variability of the essential oils of *P. mauritanica* aerial parts and roots showed homogeneity and stability of the chemical composition.

The study of antibacterial and antifungal activity of essential oils of these two plants was carried out by determining the parameter (MIC). Thus, essential oil of the aerial parts of *P. mauritanica* is the most active. The most sensitive strains are: *Citrobacter freundii* and *Candida albicans* which are inhibited with MICs values 2  $\mu\text{l/ml}$ . Similarly, the filamentous fungi were sensitive, inhibited MICs ranging between 2 and 3  $\mu\text{l/ml}$ .

**Keywords :** *Warionia saharae* Benth. & Hook., *Pulicaria mauritanica* Coss., GC(Ir), GC/MS and NMR  $^{13}\text{C}$ , Antimicrobial activity, MIC.

## المخلص

الأعمال المعروضة في هذه المذكرة تساهم في دراسة التركيبة الكيميائية لنوعين من النباتات الطبية المستخدمة في قائمة الأدوية التقليدية الجزائرية. و الهدف من هذه الدراسة من الناحية الأولى الأسهام في تحديد خصائص التركيبة الكيميائية عن طريق الفصل الكروماتوغرافي الغازي (CPG/Ir) الطيف الكتلي (CPG/SM)، الرنين المغناطيسي النووي للكربون  $^{13}\text{C}$  (RMN du C $^{13}$ ) للزيوت الأساسية المحصل عليها من صنفين من الأعشاب هما : *Warionia saharae* Benth. & Hook. و *Pulicaria mauritanica* Coss. التي تنبت تلقائيا في منطقة البكتريا للزيوت الأساسية.

الزيت الأساسي لنبتة *Warionia saharae* غني بالسيكيتريان الأوكسجينية (53.6%) الأحادية الأوكسجينية (22.7%). المركبات الغالبة هي *E*-نيروليدول (25.7%) و  $\beta$ -أوديسمول (25.0%) و ليناوول (17.1%). دراسة التغير الكيميائي للزيت الأساسي ل 16 عينة لنبات ال *Warionia saharae* بملاحظة تغير كيميائي كمي خاصة بالنسبة للمركبات التالية : - أوديسمول (17.6-32.9%) و *E*-نيروليدول (15.8-30.4%)، و ليناوول (15.3-32.1%).

الزيت الأساسي للجزء الهوائي ل *Pulicaria mauritanica* غني بالتربان الأحادية الأوكسجينية منه مركب جلي الأكثرية ، الكرفوتاناسيتون و الذي يمثل نسبة 89.2%. تركيبة الزيت الأساسي لجزء *P. mauritanica* تميزت بوجود جزئيات أساسية مشتقات أوكسجينية للبارسيمان ، 2-ديميوتوكسي-P-سيمان (37.2 / 100) إيزوبيتيرات 6-ميثوكسيثيميل (14.2 / 100) إيزوبيتيرات النيريل (11.1 / 100) ، إيزوبيتيرات ثيميل (3.1 / 100) و مودهفان 3 (4.1 / 100). هذا السيتون السيسكستربيني ثلاثي الحلقات أين البنية حددت باستعمال الرنين المغناطيسي الذ (RMN) ثنائي الأبعاد يشير لأول مرة على أنه مركب طبيعي.

دراسة التغير الكيميائي للزيوت الأساسية ل *P. mauritanica* للجزء الهوائي و الجذور أظهر تجانس و استقرار في التركيبة الكيميائية. دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا و المضادة للفطريات للزيوت الأساسية لهاتين النبتتين تمت بتحديد التركيز الأدنى المثبط (CMI) لهذه الجرثائم. هذه الدراسة سمحت لنا بإظهار القدرة العالية المضادة للبكتيريا و الفطريات للزيت الأساسي للجزء الهوائي ل *P. mauritanica*. السلالات الأكثر حساسية *Citrobacter freundii* و *Candida albicans* و المثبطة بقيم ضعيفة للتركيز الأدنى المثبط و المقدر ب 2 ميكرو لتر/مل. كذلك أظهرت الفطريات حساسية حيث تراوحت قيمة التركيز الأدنى المثبط بين 2 الي 3 ميكرو لتر/مل.

**الكلمات المفتاح :** *Pulicaria mauritanica* Coss., *Warionia saharae* Benth. & Hook., CPG(Ir), CPG/SM, RMN  $^{13}\text{C}$  ، القدرة المضادة للبكتيريا، التركيز