



FACULTE DE SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT**

OPTION

BIOCHIMIE APPLIQUEE

Thème

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE
DES ESPECES**

*Eucalyptus globulus (Myrtaceae), Smyrniun
olusatrum (Apiaceae), Asteriscus maritimus ET
Chrysanthemum trifurcatum (Asterarceae)*

Par

M^{me} DAROU-MOKADDEM HABIBA

ENCADREUR DE THESE : KABOUCHE Z.

P^f. Université de Constantine

DEVANT LE JURY

PRESIDENT: BOUZERNA N.

P^f. Université d'Annaba

EXAMINATEUR : HENCHIRI CH.

P^f. Université d'Annaba

EXAMINATEUR : AOUADI S.

M.C. Université d'Annaba

EXAMINATEUR : ZELLAGI A.

M.C. Université d'Oum El-Baouaghi

EXAMINATEUR : NECIB Y.

M.C. Université de Constantine

Année universitaire : 2011/2012

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement des maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

«La médecine traditionnelle qui est la somme totale des connaissances, compétences et pratiques reposant rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture, est utilisée pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales » (OMS, 2003).

La survie de l'Homme allait dépendre des plantes surtout parce que trois de ces acides gras vitaux ne sont présents que chez les plantes [1]. Aujourd'hui alors qu'on rejette les effets secondaires de certains médicaments modernes puissants, les plantes retrouvent leur place dans notre vie quotidienne [1].

La recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs *via* le screening de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [2].

La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs.

L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques [3]. Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique, plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles.

Dans ce contexte et notamment dans le cadre du programme de recherche lancé par notre laboratoire sur les plantes médicinales, notre choix s'est porté sur quatre plantes: *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolum olusatrum* (Apiaceae), *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae) et *Asteriscus maritimus* (Asteraceae).

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de ces plantes en principes actifs (Huiles essentielles, flavonoïdes) et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, la séparation, le diagnostic, l'identification et la quantification de ces

métabolites par l'utilisation des différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques.

Le second aspect est consacré à une évaluation des activités biologiques :

-Antimicrobienne contre un panel de bactéries et de champignons pouvant être pathogènes pour l'homme.

-Antioxydante en utilisant une méthode spectroscopique très performante, RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) qui permet de détecter les composés radicalaires.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en deux parties :

La première partie comporte quatre chapitres, consacrés à l'étude des huiles essentielles des espèces *Eucalyptus* et *Smyrniium* :

-Le premier qui est un aperçu bibliographique sur les huiles essentielles.

-Le deuxième chapitre comporte une description des travaux d'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, en plus d'une description des travaux phytochimiques antérieurs relatifs au genre.

-Le troisième chapitre comporte une description des travaux d'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de *Smyrniium olusatrum*, en plus d'une description des travaux phytochimiques antérieurs relatifs au genre.

-Le quatrième chapitre est consacré aux résultats et discussion relatifs à l'activité antibactérienne et antifongique de ces huiles en déterminant :

- ◆ Les diamètres de la zone d'inhibition
- ◆ Les concentrations minimales inhibitrices
- ◆ Les concentrations minimales destructives (bactéricides et fongicides)

La deuxième partie comprend une étude phytochimique et une étude de l'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et butanolique des espèces *Chrysanthemum trifurcatum* et *Asteriscus maritimus* respectivement, divisée en quatre chapitres :

-Le premier chapitre est un aperçu bibliographique sur les flavonoïdes isolés du genre *Chrysanthemum*.

-Le deuxième chapitre est consacré à la présentation de nos travaux d'isolement et de purification des métabolites secondaires et discussion des résultats de l'espèce *Chrysanthemum trifurcatum*.

-Le troisième chapitre est consacré à la présentation de nos travaux d'isolement et de purification des métabolites secondaires et discussion des résultats de l'espèce *Asteriscus maritimus*.

-Le quatrième chapitre comprend les résultats et la discussion relatifs à l'activité antioxydante des extraits bruts des deux plantes et des produits purs isolés de l'espèce *Asteriscus maritimus*.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

Références bibliographiques

- 1-Flemming, S., 1997.** Le livre des herbes. Comment les cultiver, les identifier et les utiliser en cuisine. Ed Chantecler, Belgique, 116.
- 2- Gurib-Fakim, A., 2006.** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27 : 1-93.
- 3-Quezel, P., Santa, S. 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS (Ed.), Paris. Tome 2.

I.1. Généralités

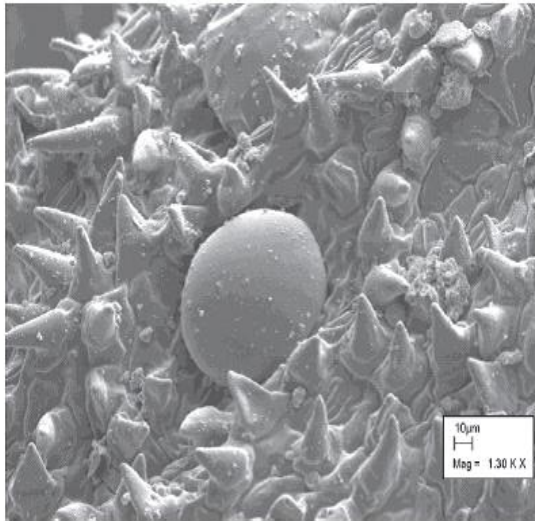
Les végétaux fabriquent leurs huiles essentielles (HE) pour se réparer, attirer les insectes pollinisateurs, se protéger du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, ou encore à guérir blessures et attaques diverses.

Les HE ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs comme l'huile de tournesol, l'huile de maïs, l'huile d'amande douce, etc.... Les HE et les arômes extraits à partir des herbes aromatiques et d'épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles [1,2]. Elles sont généralement présentes à de très faibles concentrations dans les plantes à parfum. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point telles que l'hydro-distillation, l'entraînement à la vapeur, l'hydro-diffusion, la distillation-extraction simultanée [3], au CO₂ (Supercritique) et hydro-distillation par microondes. Elles sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques. L'huile ainsi obtenue possède certaines caractéristiques physico-chimiques qu'il est possible de mesurer au laboratoire à l'aide de techniques simples ou d'appareillages plus complexes.

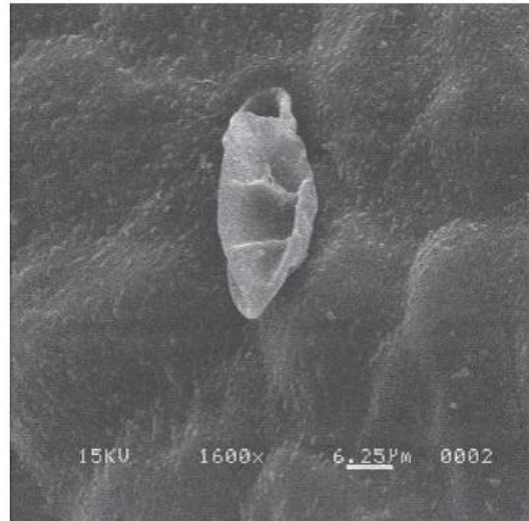
Les HE doivent répondre à des critères physiques imposés par les normes. En effet, elles sont liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est inférieure à celle de l'eau à l'exception de quelques cas (cannelle, sassafras et vétiver), volatiles, insolubles dans l'eau, rarement colorées, et solubles dans les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage. Elles sont peu polaires, et il convient de les conserver à l'abri de l'air et de la lumière [3,4].

I.1.1. L'origine dans les végétaux

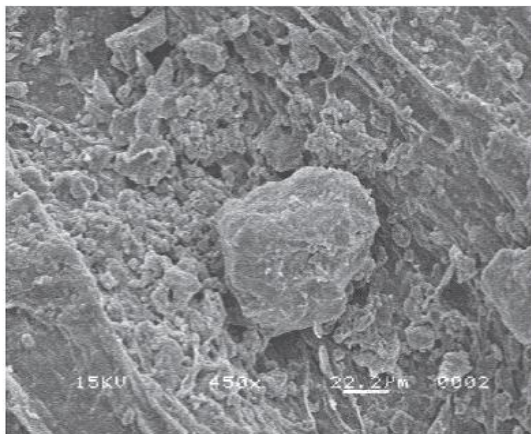
Les HE se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées [5]. Elles peuvent être stockées et emmagasinées dans diverses structures de la plante telles que les poils sécréteurs ou les trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs. La figure I.1 illustre la localisation des cellules contenant les HE pour quelques plantes aromatiques [6].



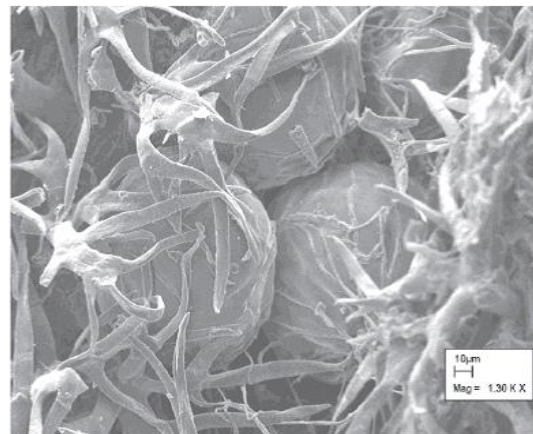
Thym



Menthe



Carvi



Lavande

Figure I.1: Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques [6].

Ainsi, l'HE peut avoir des propriétés différentes suivant la partie de la plante dont elle est extraite. Par exemple, l'HE de coriandre, issue des fruits mûrs et secs, est tonique, euphorisante et anti-infectieuse, tandis que tirée de la feuille, elle se révèle sédative et anti-inflammatoire.

I.1.2. Domaines d'utilisation

I.1.2.1. phytothérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies.

Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine

dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries [7-9]. La listerine qui est une solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les micro-organismes de la salive et de la plaque dentaire [7].

La Menthe poivrée (*Mentha piperita*) occupe une place privilégiée dans la phytothérapie digestive grâce à l'HE que renferment ses feuilles, et qui lui confère un grand pouvoir calmant des spasmes intestinaux.

Des études très récentes ont montré que le géraniol a une action sur les cellules cancéreuses du colon [10], en plus de l'activité anti-inflammatoire, récemment mise en évidence [11].

Juven et coll. [12] ont obtenu une diminution importante des cellules vivantes de *Salmonella thyphimurum* en la traitant par l'huile de thym et ses constituants actifs.

Une étude *in vitro* a montré l'effet antiviral de l'HE d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle [13].

L'effet de l'huile de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil) et celle d'*Eucalyptus* d'origine australienne ont été testées sur le virus de l'herpès simplex dans des cultures cellulaires [14].

I.1.2.2. Utilisation en aéro-ionisation.

Dans les locaux, on peut aseptiser l'atmosphère avec un ionisateur d' HE. Il se forme ainsi des aérosols vrais aromatiques, ionisés, créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère [15-17].

I.1.2.3. Parfumerie et cosmétologie

Dans ce domaine, les HE semblent reprendre actuellement le dessus sur les produits de synthèse classiques tel que l'hexachlorophène.

Le cinéole, par exemple, entre dans la fabrication des savons de toilette, des aérosols et des lotions désodorisantes [18]. De même Beylier-Maurel [19], a réuni une vingtaine de composés bactériostatiques en formulation harmonieuse de point de vue olfactif. Elle a aussi démontré la grande activité de l'HE de bois de Santal sur la microflore de la peau, d'où son utilisation en cosmétique. Des usages similaires ont été réalisés avec les essences de Camomille [20].

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable [21-23].

I.1.2.4. Conservation des denrées alimentaires

La préservation des produits alimentaires à caractère périssable constitue un des domaines d'utilisation des plantes aromatiques et médicinales.

La lutte contre les champignons toxigènes est l'un des objectifs de cette conservation, en effet ces micro-organismes élaborent des substances toxiques, les aflatoxines, les ochratoxines et les zéaralenones, réputés pour leurs effets hépatotoxique et cancérigène [24-26].

Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires [27-30].

La quantité d'épices et d'aromates habituellement utilisés étant faible, leur pouvoir antimicrobien semble synergique [31-33].

Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des HE, le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire [34]. Ils y sont rajoutés pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires [35, 36].

L'eugénol et le cinnamaldéhyde, extraits à partir d'HE du *Cinnamum*, comptent parmi les principaux agents de conservation alimentaire, d'origine végétale. Ils sont employés comme additifs pour la préservation des olives de table contre la flore cryptogamique, [37, 38].

I.1.3. Composition chimique des HE

Les HE sont des mélanges complexes et variés, constitués de composés organiques de structures et de fonctions chimiques très diverses. Généralement, on classe ces composés en deux groupes : les hydrocarbures terpéniques et les composés oxygénés.

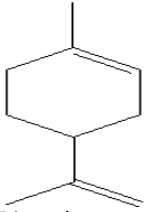
Les composés de type terpénique sont largement rencontrés dans les HE, ils sont formés d'un multiple pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ou appelé encore isoprène.

On distingue ainsi selon le nombre de carbone constituant les molécules de ce groupe: les monoterpènes (C 10), les sesquiterpènes (C 15), et moins fréquemment les diterpènes (C 20), les triterpènes (C 30) et les tétraterpènes (C 40). C'est précisément parce que les terpènes proviennent de l'isoprène, qu'ils sont également nommés isoprénoïdes ou terpénoïdes. Plus strictement, le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène.

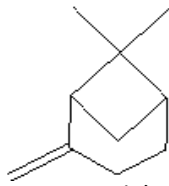
Les terpènes les plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée telles que les mono et les sesquiterpènes.

Monoterpènes

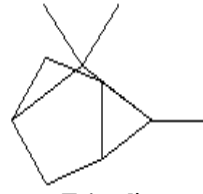
Hydrocarbures



Limonène
Odeur fraîche
rappelant l'orange

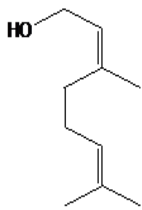


α-pinène
Odeur de pin

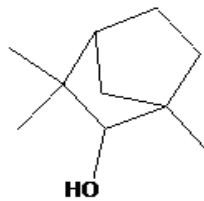


Tricyclène
Présent dans beaucoup
d'huiles essentielles

Alcools

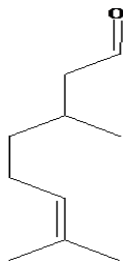


Nérol
Odeur agréable de rose

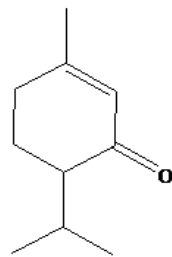


Endo-fenchol

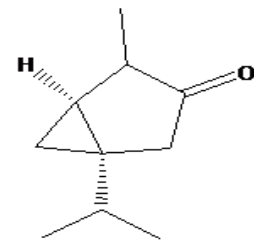
Aldéhydes et cétones



Citronellal
Odeur fraîche
de citronnelle

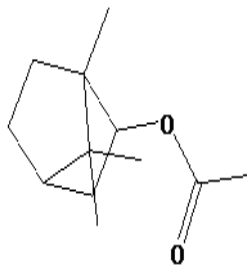


Pipéritone
Odeur de menthe
poivrée

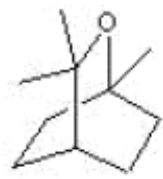


Cis-Thujone

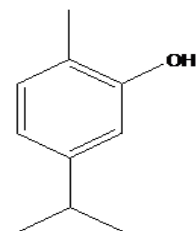
Esters, éthers et phénols



Acétate de Bornyle



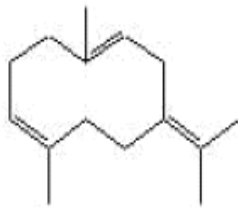
1,8-cinéole
Odeur typique de
l'*Eucalyptus globulus*



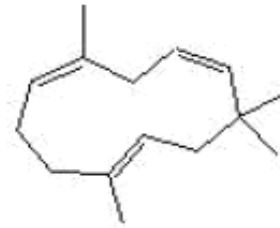
Carvacrol
odeur de thymol présent
dans certains origans

Sesquiterpènes

Hydrocarbures

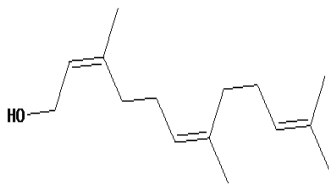


Germacrène B

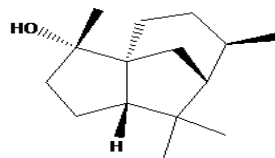


α -Humulène

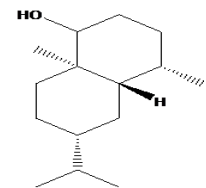
Alcools



Cis-Cis-Farnésol



Cédranol



Eudesmol

Figure I.2 : Exemples de structures de terpènes

I.1.3.1. Les fonctions biologiques de terpènes

Les plantes produisent une grande variété de produits formés à base d'isoprène, certains d'entre eux sont des métabolites primaires comme des stéroïdes et des groupes prosthétiques des enzymes et vitamines en chaînes latérales (vitamine K, E). Certains sont des hormones végétales comme l'acide abscisique ou les gibbérellines (diterpènes). Cependant la majorité des composés terpéniques sont des métabolites secondaires sans fonction directe dans la croissance des végétaux. Ces métabolites sont responsables de la couleur et l'odeur des plantes et des épices (piments, curies), certains d'entre eux ont des fonctions écologiques importantes mais la majorité (les mono- et sesquiterpènes) possèdent une activité antimicrobienne contre un large éventail des bactéries et champignons. Par ailleurs, un certain nombre de terpènes ont des propriétés toxiques, répulsives ou attractives pour d'autres organismes, ce qui a conduit à la conviction qu'ils ont des rôles écologiques dans les interactions antagonistes ou mutualistes entre les plantes et plantes-animaux [39].

I.1.4. Principales méthodes d'extraction d'HE

Il existe plusieurs méthodes d'extraction d'HE dont voici les principales :

I.1.4.1. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur descendant ou ascendant sans macération préalable. Le plus souvent, de la vapeur d'eau est injectée au bas d'une charge végétale. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles) [40, 41]. Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydrodistillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion.

I.1.4.2. L'hydro-distillation

Le principe de l'hydro-distillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux [42].

I.1.4.3. La distillation à vapeur saturée

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des HE à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'HE recueillie sont minimisées [42].

I.1.4.4. L'hydro-diffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques

classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie [42].

I.1.4.5. L'expression à froid

L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les HE des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'HE est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'HE, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau [42].

I.1.4.6. Extraction par CO₂ super critique

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂ et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant [42].

I.1.5. Autres méthodes d'obtention des extraits volatils

I.1.5.1. Extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants [42].

I.1.5.2. Extraction par les corps gras

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer

en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite [42].

I.1.5.3. Extraction par micro- ondes

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelé Vacuum Microwave, Hydro-distillation (VMHD) consiste à extraire l'HE à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants: rapidité, économie du temps, d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvant résiduel [42- 44].

I.1.6. Effets indésirables des HE

Bien que certaines HE peuvent présenter de grands risques, comme l'essence de sabiné qui induit des hémorragies utérines chez la femme [45], aussi l'effet convulsif des HE de camphre et d'*Eucalyptus* chez les jeunes enfants est ainsi connu depuis longtemps, la majorité des HE ne sont pas toxiques et sont absolument sans danger lorsqu'elles sont utilisées de manière contrôlée.

En général, La phyto-aromathérapie ne peut être considérée comme une médecine douce surtout si elle est pratiquée de manière anarchique. Comme le disait le fameux dicton de Paracelse : « Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose compte ».

I.2. Activité antimicrobienne des HE

Les premiers signes d'une thérapie antimicrobienne réussie datent des temps les plus reculés. Dans les civilisations, Egyptienne, Grecque, Chinoise et Arabe, on rapporta l'utilisation des extraits de plantes pour cette fin. Sans comprendre le mécanisme par lequel ces remèdes naturels agissaient, bon nombre d'entre eux ont gardé leurs applications jusqu'à nos jours.

Avec la découverte de la pénicilline en 1929 par Fleming, puis d'autres antibiotiques, tels que la Streptomycine, le Chloramphénicol, l'Erythromycine par Waksman en 1949, le progrès dans le développement d'antimicrobien a connu un grand essor [46]. Les produits naturels se virent momentanément reléguer au second plan jusqu'à l'apparition des premiers signes de résistance microbienne : Certaines espèces pathogènes, sont en moins sensibles aux

antibiotiques et développent des résistances multiples à ces derniers. Ces antibiotiques ont montré aussi d'autres inconvénients et des limites d'utilisation: les effets secondaires, toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité et les difficultés rencontrées dans le traitement des maladies exigeant la destruction des germes pathogènes indépendamment des facultés de défense du malade (patients immunodéprimés) [47].

Notons aussi que tous les antibiotiques ne sont pas indistinctement actifs sur tous les agents pathogènes. C'est ainsi que, pour tout nouvel antimicrobien, on doit définir le "spectre d'activité" qui correspond à l'ensemble des micro-organismes sur lesquels il exerce efficacement son action.

Les HE ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudo-mycélium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Il est intéressant de rappeler l'importance d'utiliser la totalité de l'HE ou « totum », où l'effet synergique de plusieurs composés majoritaires sont plus puissants que l'action seule du composé biochimique majoritaire [48]. Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antimicrobienne des HE car la nécessité de trouver des solutions est à l'ordre du jour. L'usage des HE, grâce à leur forte action antimicrobienne développé depuis plus d'une vingtaine d'années, constitue un sérieux substitut au traitement par les antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

I.2.1. Bases biochimiques de l'activité antimicrobienne

Le mécanisme par lequel les antimicrobiens agissent, a été bien établi, et a permis de les classer suivant leurs sites d'action :

- certains inhibent la synthèse de la paroi bactérienne.
- d'autres altèrent la membrane cytoplasmique, provoquant des troubles du taux de perméabilité.
- certains inhibent la synthèse des acides nucléiques.
- beaucoup perturbent la synthèse protéique au niveau du ribosome.

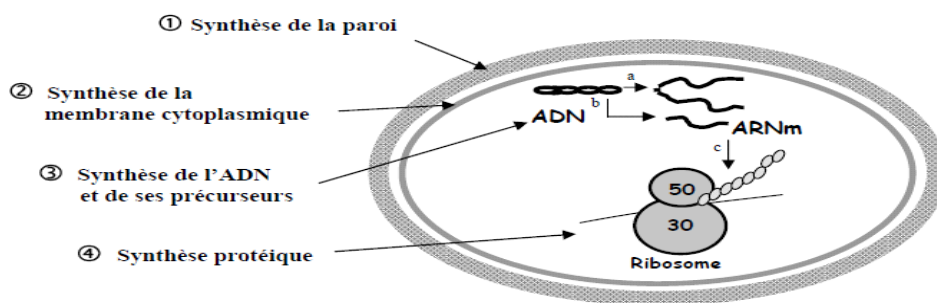


Figure 4. Mode d'action des antibiotiques
(a : réplication de l'ADN, b : transcription de l'ADN, c : traduction de l'ARNm)

Figure I.3 : Mode d'action des antibiotiques

(a : réplication de l'ADN, b : transcription de l'ADN, c : traduction de l'ARNm)

I.2.2. Mode d'action antimicrobienne des HE

L'objectif principal de cette partie est la présentation de l'action antimicrobienne des HE, des mécanismes d'action de ces composés sur les microorganismes et de certains facteurs déterminant cette activité.

L'activité anti-microbienne des extraits de plantes est liée principalement aux profils chimiques. Plusieurs familles chimiques sont représentées dans la même préparation : Les HE peuvent comporter plus de soixante composants différents dont le composant majeur peut constituer de plus de 85% des HE [48]. Les terpènes et les phénylpropanoïdes constituent les composants actifs les plus importants des HE, dont les mono- et sesquiterpénoïdes forment la majeure partie [50].

Cette remarquable diversité constitutionnelle permet d'expliquer l'étendu du champ d'action des actifs. Cependant le mécanisme par lequel ils agissent sur les micro-organismes reste difficile à cerner, étant donné que chaque constituant de l'huile possède son propre mode d'action. Il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire [51]. De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HE sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules [52].

Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+): ce mécanisme a été observé avec l'huile de l'arbre à thé sur les bactéries

Gram⁺ (*Staphylococcus aureus*) et Gram⁻ (*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* [51, 53].

En étudiant le mécanisme d'inhibition des micros-organismes fongiques par certains aldéhydes, certains auteurs ont montré que l'effet inhibiteur était essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire [54]. Ces auteurs ont montré également qu'il y a formation d'un complexe entre le donneur d'électron et l'aldéhyde, induisant un changement de l'état ionique de la membrane qui se traduit par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur. Cet état entraîne une mort certaine de la cellule fongique.

On peut aussi citer les observations en microscopie électronique à transmission réalisées par Franchomme [55] qui montrent une désorganisation de l'enveloppe des cellules microbiennes sous l'effet de certaines HE riches en molécules portant le groupement phénol (*Origanum compactum*).

Selon Masson et Wasserman [56], les composés phénoliques exercent leur pouvoir antimicrobien *via* un mécanisme similaire à celui des aldéhydes, avec une efficacité inhibitrice proportionnelle à leur degré d'hydrophobicité.

Cependant, en étudiant l'effet antimicrobien de composés de la même famille, tel que l'eugenol, d'autres auteurs affirment que le site privilégié des phénols était la membrane plasmique [57]. A faible concentration, les composés phénoliques produisent un effet réversible, alors qu'à forte dose, ils entraînent une coagulation générale avec une mort des cellules microbiennes [58].

L'étude du mécanisme d'action du géraniol sur des souches de *Candida albicans* et de *Saccharomyces sp*, a montré que celui-ci exerce son pouvoir antifongique en agissant directement sur la membrane plasmique. La voie de biosynthèse de l'ergostérol, composant majeur de la membrane fongique n'était pas affecté [59].

Kurita et Koike ont étudié l'activité antifongique des alcools primaires, des composés phénoliques, des aldéhydes aromatiques et des acides organiques. Ils se sont rendu compte que celle-ci augmente avec l'hydrophobicité de ces composés, ce qui suggère des interactions hydrophobes entre ces composés et les cellules fongiques testées [60].

Certains composés phénoliques des HE interfèrent avec les protéines de la membrane des micros-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la

membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP [60, 61]. Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée [62].

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes agissaient sur les cellules bactériennes en induisant une rupture de la paroi et de la membrane microbienne. Le contenu cellulaire est libéré à l'extérieur en parallèle avec la mort cellulaire [63-65]. Le premier indice de cette détérioration est le largage du potassium intra-cytoplasmique, suivi par la libération d'acides nucléiques, de l'ATP, et du phosphate inorganique [57, 65, 66].

Les HE peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides [67]: En 1994, Bouchikhi avait comparé le mode d'action de la polymyxine B, un antibiotique réputé pour son effet membranaire, avec celui des HE du girofle et d'origan. Dans le milieu extracellulaire, il a pu mettre en évidence, par électrophorèse, la présence de bandes d'acides nucléiques dans le cas des HE étudiées, alors que pour la polymyxine B, seuls quelques nucléotides libres et bases azotées ont été détectés.

Le mode d'action des HE dépend aussi du type de microorganismes: en général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram - est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable [68].

I.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des HE

La technique utilisée est celle de l'aromatogramme, identique à celle de l'antibiogramme utilisé pour tester les antibiotiques. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des HE chémotypées. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible. Les prélèvements effectués dans les cavités ou muqueuses (crachat, selles, urine, mucus, pus, frottis vaginal...) sont préparés puis mis en contact avec différents milieux nutritifs (géloses enrichies) sur boîtes de Pétri. Placés dans une étuve à 37,5 °C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif.

Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries (6 à 8 par boîte) de petits disques de papier buvard imprégné de différentes HE à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence

à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles utilisées.

Une classification des HE chémotypées en rapport avec leur spectre d'activité antimicrobienne peut être établie en fonction de l'importance du halo d'inhibition. L'aromatogramme représente donc un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques.

I.2.4. Aperçu sur les techniques d'étude du pouvoir antimicrobien des HE

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations.

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

Nous allons essayer d'énumérer ces différentes méthodes et de discuter chacune d'elle.

I.2.4.1. Techniques en milieu liquide

I.2.4.1.1. Méthode des disques de Sarbach

L'essence est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'ensemble est placé dans des tubes à essai. Dans chaque tube est réparti un certain volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation.

L'action bactéricide totale est confirmée par repiquage en milieu liquide d'une anse prélevée sur le milieu liquide de subculture. Le pouvoir bactéricide partiel est apprécié par l'évaluation du pourcentage de survivants par repiquage en milieu solide [69, 70].

I.2.4.1.2. Méthode de Marzuella

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'HE dans l'éthanol. Les solutions mères sont préparées dans l'éthanol 95%, la solution alcoolique est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement ensemencé. Après la durée d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) [70].

I.2.4.2. Techniques en milieu solide

I.2.4.2.1. Méthode de Vincent

Elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme [72]. Dans cette méthode, on utilise des disques de papier filtre de 10 mm de diamètre, imprégnés d'HE et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm. La dilution des HE se fait toujours dans un solvant tel que l'éthylène glycol [73], l'acétone [74], l'éthanol à 95% [75]. Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'HE par diffusion dans la gélose. Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux HE [76].

Une variante de cette technique consiste en l'aménagement de cavité à l'emporte pièce, dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. On remplit cette cavité d'un volume donné d'HE qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente [77].

I.2.4.2.2. Méthode de Morel et Rochaix

Elle permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien des HE par solubilisation dans l'alcool à différentes concentrations et incorporation de chacune des concentrations dans un milieu gélosé, ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. L'alcool faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu [78].

I.2.4.2.3. Méthode de microatmosphère

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes tests, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'HE sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance [78].

I.2.5. Détermination des CMI et CMB par dispersion des HE dans le milieu de culture

Cette technique de détermination des CMI par contact direct en milieu gélosé ou liquide, consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié [79]. Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de

diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux.

Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'émulsions des HE dans des solutions de différents détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 [79, 80] ou de solvant comme l'éthanol [78].

La plupart des méthodes utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs [81]. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus dans l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'HE.

Bon nombre d'études ont montré que la sensibilité d'un même germe vis-à-vis d'une même HE diffère selon la méthode utilisée ou selon le mode de dispersion de l'HE dans le milieu de culture, ce qui rend toute comparaison inexacte et pousse les chercheurs à bien choisir et améliorer les techniques d'étude.

L'origine de ces critiques est aussi la variation de la densité bactérienne utilisée pour l'inoculum ainsi que la difficulté à déterminer le meilleur agent émulsifiant pour avoir des proportions minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) reproductibles et comparables entre les différents manipulateurs.

D'autres critiques ont été soulevées concernant l'interaction entre les agents émulsifiants et les constituants des HE car, en raison de leur faible solubilité, les agents utilisés pour la dispersion des HE dans le milieu de culture bactérien, représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antibactérienne.

Références bibliographiques

- 1- Association française de Normalisation, Huiles essentielles, Tome1- Echantillonnage et méthode d'analyse, Tome 2-Vol.1 et 2, Monographies relatives aux huiles essentielles, 6^{ème} édition. Afnor, Paris, 2000.
- 2- **Garnero, J., 1996.** les huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, K 345, Paris.
- 3- **Durvelle, J.P., 1893.** Fabrication des essences et des parfums : Extraction des essences et des parfums par distillation, par expression et par les dissolvants. J. Fritsch, Paris.
- 4- **Durvelle, J.P., 1930.** Fabrication des essences et des parfums : Chimie des parfums. Desforges, Girardrot et Cie, Paris.
- 5- **Charabot, E., Dupont, J., Pillet, L., 1899.** Les huiles essentielles et leurs principaux constituants. Ch. Beranger, Paris.
- 6- **Loupy, A., 2006.** Microwaves in Organic Synthesis, 2ieme édition, Tome I et II. Wiley-VCH, Weinheim,
- 7- **Kato, T., Lijima, H., Ishihara, K., Kanek, T., Hirai, K., Naito, Y., Okuda, K., 1990.** Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. Bull. Tokyo. Dent. Coll. 31(4):301-307.
- 8- **Schwartz, R., Davis, R., Hilton, T.J., 1992.** Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. Am. J. Dent. 5 (3): 147-150.
- 9- **Sourai, P.G., 1989.** Antimicrobial action of dental materials used in operative dentistry: a review Odontostomatol. Proodos. 43 (5): 399-408.
- 10- **Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Duranton, B., Gosse, F., Seiler, N. Raul, F., 2001.** Geraniol, a Component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. J. Phamacol. Exp. Ther. 298 (1): 197-200.
- 11- **Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de-Lima, Jr., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernadez Ferreira, E., Soares, R.O.A., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimaraes, A.C., Zoghbi, M.G.B., Henriques, M.G.M.O., 1999.** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. J. of Ethnopharmacology, 66 (1): 57- 69.
- 12- **Juven, B., Kanner, J., Schved, F., Weisslowiez, H., 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacterial. 76: 626-631.

- 13- **Siddiqui, Y.M., Ettayebi, M., Haddad, A.M., Al-Ahdal, M.N., 1996.** Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on *herpes simplex* virus type 1 and Newcastle disease virus. *Med. Sci.Res.* 24: 185-186.
- 14- **Schnitzler, P., Schon, K., Reichling J., 2001.** Antiviral activity of Australian tea oil and *Eucalyptus* oil against *herpes simplex* virus in cell culture. *Phamazie.* 56(4): 343-347.
- 15- **Taldykin, O.E., 1979.** Use of phytoncidic activity of essential oils for improving the air in sealed place. *Rol Biogeotsenozkh Znach Med Mater Soveshch.* 1: 201-203.
- 16- **Makarchuk, N.M., Krivenko, V.V., Akimov, Yu.A., Smorodinskaja, V.G., Marchenko, K.P., 1981.** Antimicrobial activity of essential oils-peppermint, lavender, wormwood and lemon. *Khim. Vzaimodeistive. Rast.* 1: 146-150.
- 17- **Inyoue, S., Goi, H., Miyouchi, K., Ogihara, M., Iwanami, I., 1983.** Inhibitory effect of volatil components on the proliferation of bacteria. *Bokin.Bobai.* 11 : 609-615.
- 18- **Borris, R.P., 1996.** Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* 51: 29-38.
- 19- **Beylier–Maurel, MF., 1976.** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista italiana,* 58 : 283-286.
- 20- **Schilcher, H., 1985.** « Effets and side effets of essential oils » in « essential oils and aromatic plants. 217-231. Baerheim, A. Schefer J. J. C. (Eds). Dordrecht, Holland.
- 21- **Maruzzella, J.C., 1962.** The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals. *Am. Perfum. Cosmet.* 77(1): 67-72.
- 22- **Roulier, G., 1992.** Les huiles essentielles pour votre santé. *Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes.* Edt. Dangles. France,
- 23- **Vargas, I., Sanz, I., Prima-Yufer, E., 1999.** Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil. *J. Food Prot.* 62(8): 929-932
- 24- **Fan, J.J., Chen, J.H., 1999.** Inhibition of aflatoxin-producing fungi by welsh onion extracts. *J. Food protection.* 62: 414-417.
- 25- **Tantaoui- Elaraki, A., Beraoud, L., 1994.** Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oil s of selected plant materials. *J. Environ. Pathol. Toxicol oncol.* 13: 67-72.

- 26- **Hitokoto, H., Morozomi, S., Wauke, T., Sakai, S., Kurata, H., 1980.** Inhibitory effects of spices on growth and growth and toxin production of toxinogenic fungi. *App. Env. Microbiol.* 39: 818-822.
- 27- **Arora, D.S., Kaur, j., 1999.** Antimicrobial activity of spices. *Int j Antimicrob Agents;* 12: 257-62.
- 28- **Lachowicz, K.J., Jones, G.P., Briggs, D.R., Bievenu, F.E., Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M.J., 1998.** The synergitic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Lettr Appl Microbio.* 26: 209-14.
- 29- **Hitokoto, H., Morozomi, S., Wauke, T., Sakai, S., Ueno, I., 1978.** Inhibition effects of condiments and herbal drugs on growth and toxin production of toxinogenic fungi. *Mycopathologia.* 66: 161-167.
- 30- **Beraoud, L., Bessière, J.M., Tantaoui Elaraki, A., 1991.** Chemical composition of the essential oils of selected plant materials used in Moroccan cuisine. *Al-Birunya Rev. Mar. Pharm.,* 7: 49-69.
- 31- **Beuchat, L.R., 1976.** Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food. Sc.,* 41: 899-902.
- 32- **Bilgrami, K.S., Sinha, K.K., Sinha, A.K., 1992.** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* 96: 171-175.
- 33- **Madhyasta, M.S., Bhat, R.V., 1984.** *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory action of their chemical constituents. *Appl. Environ. Microbial,* 48: 376-379.
- 34- **Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl Microbiol.,* 86(6): 985-990.
- 35- **Busta, F.F., Foegeding, P.M., 1980.** Chemical food preservatives. In S. block. "Disinfection, sterilization and preservation", 656-694. Lea and Fibiger Eds, Philadelphia. USA.
- 36- **Hitokoto, H., Morozomi, S., Wauke, T., Sakai, S., Kurata, H., 1980.** Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbil.,* 39: 818-822.
- 37- **Wild, R. 1994.** The complete book of natural and medicinal cures. Rodale Press, inc., Emmaus, Pa.

- 38- **Kiwank, M., Akgul, A., 1990.** Mold growth on black table olives and preservation by sorbic acid, methyl-eugenol and spice essential oil. *Nahrung*, 34: 369-73.
- 39- **Langenheim, J. H. 1994.** Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. of Chemical Ecology* 20: 1223-1280.
- 40- **Crouzet, J., 1996.** Arômes alimentaires. *Techniques de l'ingénieur*, F 4 100, Paris.
- 41- **Peyron, L., 1992.** Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques, Chapitre 10 : 217-238. Cité dans : Les arômes alimentaires. Coordonayeurs H. Richard et J.L. Multon. Tec et Doc-Lavoisier et Apria, p: 438, Paris,
- 42- **Chemat F., 2009.** Essential oils and aromas: Green extractions and Applications. HKB Publishers, Dehradun, 311 pages. ISBN : 978-81-905771-3-7.
- 43- **Brian, M.L., 1995.** The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA), 57-148.
- 44- **Mompon, B., 1994.** Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO₂, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4^{ème} rencontre internationale de Nyons, 149-166.
- 45- **Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales.3^e édition. Ed. Tec et doc. Paris.
- 46- **Neu, H.C., 1988.** Update on antibiotics. *Med. Clin.N Am* 72: 555.
- 47- **Siegenthaler, W., Luthy, R., 1978.** Current chemotherapy. Proceeding 10th international congress of chemotherapy. II. Washington DC, Am. Soc. Microbial.
- 48- **Lahlou, M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytoth. Res.* 18, 435-448.
- 49- **Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2001.** Common Fragrance and Flavour Materials: Preparation, Properties and Uses Wiley-VCH, Weinheim.
- 50- **Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.V., Castillejos, L., Ferret, A., 2007.** Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. of Dairy Science* 90: 2580-2595.
- 51- **Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V., 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemoth.* 46: 1914–1920.

- 52- **Davidson, P. M., 1997.** Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M.P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) Food Microbiol. 520- 556. ASM, Washington.
- 53- **Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Gustafson, J.L., Warmington, J.R., Wyllie, S.G., 2000.** The mode of antimicrobial actions of *Malaleuca alternifolia* (Tea tree oil). J. Appl. Microbiol. 88: 170-175.
- 54- **Kurita, N., myaji, M., kurane, R., Takahara, Y., Ichimara, K., 1979.** Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. Agric. Boil. Chem. 43: 2365-2371.
- 55- **Franchomme, P., 1981.** L'aromatologie à visée anti-infectueuse. Phytomédecine. 1: 25-47.
- 56- **Masson, T.L., Wasserman, B. P., 1987.** Inactivation of red beet β -glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. Phytochem. 26: 2197- 2202.
- 57- **Boônchrid, C., Flegel, T.W., 1982.** In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *candida albicans* and *cryptococcus neoformans*. Can J. Microbio. 28: 1235-1241.
- 58- **Mc Donnel, G., Russell, D., 1999.** Antisptics disinfectant: Activity, action and resistance. Clin. Micro Rev. Jan 147-179.
- 59- **Bard, M., Albrecht, M.R.N. Gynnet, C.J., Stillwell, W., 1988.** Geraniol interferes with membrane function in strains of *candida* and *sacchaaromyces*. Lipids. 23:534-538.
- 60- **Kurita, N., Koike, S., 1982.** Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. Agric. Bil. Chem. 46: 159-165.
- 61- **Knobloch, K.A., Pauli, B., Iberl, H., Weigand, N., Weis. 1989.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. of Ess. Oil Res. 1: 119-123.
- 62- **Sikkema, J., De Bont, J. A. M., Poolman, B., 1995.** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews 59: 201-222.
- 63- **Wendakoon, C. N., Sakaguchi, M., 1995.** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. J. of Food Protection. 58: 280– 283.
- 64- **Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A., 1997.** Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). J. Ethnopharmacol. 58: 85-88.

- 65- **Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Linuma, M., 1996.** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J.Ethnopharmacol.* 50: 27-34.
- 66- **Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999.** Influence of organic matter, cations, and surfactants on antimicrobial activity of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil) *in vitro*. *J. Appli. Microbio.* 86: 446-452.
- 67- **Johansen, C., Verheul Gram, L., Abee, T., 1997.** Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *App. Env. Micobio.* 63: 1155- 1159.
- 68- **Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M. Vampa, G., Bellotti, A., Mazza, P., 1991.** Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and *Salmonella*/Microsome Reversion Assay. *Planta Medica* 57: 237-241.
- 69- **Dorman, H.J.D., Deans, S. G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. of Applied Microbiology* 88: 308-316.
- 70- **Banquour, N., 2000** Etude de l'effet de thym (décoction) et de son huile essentielle sur l'évolution de la flore microbienne et quelques paramètres chimiques du Smen, au cours de son élaboration. Thèse de doctorat de 3ème cycle en microbiologie. Université Cadi Ayad, faculté des Sciences, Marrakech.
- 71- **Jacob, M., Pellecuer, J. Tomei, R. 1979.** Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: 26-30.
- 72- **Dayal, B., Purohit, R.M., 1971.** Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. *The flavor industry*, 2: 484-485.
- 73- **Martinez Nadal, N.G., Montalvo, A.E., Seda, M., 1973.** Antimicrobial properties of bay and other phenolic essential oils. *Cosmetics and perfumery.* 88: 37-38.
- 74- **Conner, D.E., Beuchat, L.M., 1984.** Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food. Sci.* 49: 429-434.
- 75- **Cornet, F., 1981.** L'aromatogramme. *Phytomédecine*, 1et 2, 109-117.
- 76- **Tharib, S.M., Gnan, S.O., Veitch, G.B.A., 1983.** Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. *J. Food. Prot.* 46: 681-685.
- 77- **Beylier-Maurel, M.F, 1976.** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.,* 58: 283-286.

- 78- **Drugeon, H., Legallou, F., Caillon, J., 1991.** Méthodes d'étude de l'activité bactéricide. Aspects théoriques et thérapeutiques. Edité par : Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J.P et Goldstein F. Maloine Paris.
- 79- **Allegrini, J., Simmeon de Buochberg, M., Billot, A., 1973.** Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier, 33 : 73-86.
- 80- **Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaili-Alaoui, M., Ayadi, A., 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes Médicinales et Phytothérapie. 20(2): 155-167.
- 81- **Narashima Rao, B.G.V., Subba, R., 1972,** The efficacy of some essential oils on pathogenic fungi. II. The flavor industry. 3: 368-370.

II.1. Présentation botanique et géographique de la famille des Myrtaceae

La famille **Myrtaceae - Myrtacées** est une famille de plantes dicotylédones, deux cotylédons sur l'embryon, deux feuilles constitutives de la graine. Les Myrtaceae sont réparties en environ trois mille espèces réparties en 134 genres environ.

Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques des zones tempérées, sub-tropicales à tropicales, poussant principalement en Australie, en Amérique tropicale, région méditerranéenne, l'Afrique subsaharienne, Madagascar, tropicales et tempérées d'Asie, et les îles du Pacifique. Dans cette famille, on peut citer les genres : *Eucalyptus*, *Psidium* dont fait partie le goyavier, *Myrtus* dont fait partie le myrte (arbuste du maquis méditerranéen), *Eugenia* dont le giroflier (*Eugenia caryophyllata*) qui donne le clou de girofle. On rencontre aussi des espèces dont les fruits sont comestibles (genres *Feijoa*, *Eugenia*, *Campomanesia*). Il existe aussi une espèce de figuier étrangleur en Nouvelle-Zélande (*Metrosideros robusta*) [1].

Beaucoup d'espèces appartenant à cette famille sont une source d'HE pour la parfumerie ou pour l'usage thérapeutique.

Les fleurs à odeur suave des Myrtaceae sont pollinisées par divers insectes, oiseaux ou mammifères ; le nectar sert de monnaie d'échange. Chez les genres *Eucalyptus*, *Melaleuca* et *Callistemon*, les étamines sont plus remarquables que les pétales, donnant à l'inflorescence un aspect de goupillon. Les espèces à fruit charnu sont disséminées par les oiseaux et les mammifères ; les espèces à fruits capsulaires ont de petites graines parfois ailées qui sont disséminées par le vent ou par l'eau [1].

II.2. Intérêt biologique de la famille des Myrtaceae

Beaucoup d'espèces de cette famille possèdent des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Les propriétés antioxydantes d'*Eucalyptus saligna* et *Eucalyptus rostrata* ont été vérifiées et confirmées suite à différents travaux [1].

II.3. Présentation botanique et géographique du genre *Eucalyptus*

Les *Eucalyptus* sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur, originaire d'Australie, notamment de la province de Tasmanie ; l'*Eucalyptus* fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, l'*Eucalyptus* assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom d'« arbre à la fièvre » ou *Australian fevertree*.

La plupart des *Eucalyptus* ont des feuilles persistantes. Comme les autres membres de la famille des myrtaceae, les feuilles d'*Eucalyptus* sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre.

Les feuilles, bleutées, ont une curieuse caractéristique: sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales et glauques, et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes, pétiolées, très allongées, parfois un peu courbées comme des lames de faux, et d'un vert luisant.

Les fleurs forment une petite boîte s'ouvrant par un couvercle : les étamines sont enfermées dans un étui fermé par un opercule (**d'où le nom d'*Eucalyptus* du grec *eu* = bien et *kaluptos* = couvert**) formé par la fusion des pétales et/ou des sépales.

Les fleurs sont très variées. Elles ont de très nombreuses étamines qui peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, rose ou rouge.

Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol [1].

De nombreux *Eucalyptus* sont utilisés dans le monde pour produire du bois de service: poteaux, bois de mine, bois de feu, perches, bois de construction.

II.4. Propriétés thérapeutiques du genre *Eucalyptus*

De nombreux pays ont rapidement intégré les usages médicaux des feuilles d'*Eucalyptus* dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, Île de la Réunion, Europe, etc.

La production commerciale d'huile essentielle d'*Eucalyptus* a débuté en 1860, dans la région de Victoria en Australie. Actuellement, l'Australie, le Maroc, l'Espagne et certains pays de l'ex-URSS sont parmi les principaux producteurs.

Au XIX^e siècle, on utilisait l'HE pour aseptiser les cathéters urinaux dans les hôpitaux anglais. De nombreuses préparations pharmaceutiques destinées aux diverses affections des voies respiratoires (Vicks Vaporub, par exemple). De nos jours, elle entre dans la fabrication de rince-bouche (Listerine, par exemple) et de dentifrices ; les produits et les solvants endodontiques utilisés en dentisterie comprenant de l'huile de plusieurs plantes entre autre l'huile de clou de girofle et d'*Eucalyptus* [2]. On s'en sert aussi comme dégraissant industriel. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles d'*Eucalyptus*, de l'HE (*E. globulus*) pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme,

pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (voie externe).

Des essais sur des souris ont cependant permis d'observer que l'*Eucalyptus* exerce une activité antidouleur [3,4]. On pense généralement que cette activité serait attribuable aux propriétés antioxydantes de la plante [5].

L'HE d'*Eucalyptus citronné* (*E. citriodora*) est un remède traditionnel pour éloigner les insectes piqueurs [6]. Au cours d'une étude croisée menée en Suède, un insectifuge à base d'*Eucalyptus citronné* (Citriodiol) a réduit de moitié les morsures de tiques (*Ixodes ricinus*) subies par 111 participants à des activités de plein air. Au cours d'un essai effectué en Malaisie, un produit à base d'*Eucalyptus citronné* a été très efficace pour prévenir les morsures de sangsues (*Haemadipsa sylvestris*) [7,8].

La fumée d'*Eucalyptus camaldulensis* est également employée dans les lieux de stockage des denrées comme agent de Conservation contre les insectes et les champignons. L'efficacité de cette pratique serait due à la richesse de la fumée en thymol et en cinéole [9].

II.5. Principaux Composants chimiques du genre *Eucalyptus*

- Huile essentielle (Oxydes terpéniques :1,8-cinéole; monoterpènes : alpha-pinène, limonène, gamma-terpinène, paracymène ; Sesquiterpènes : aromadendrène ; Sesquiterpénols : globulol, lédol)
- Flavonoïdes (des hétérosides de flavones avec les aglycones suivants : quercétine, myricétine, kaempférol et rutine).
- Tanins

II.6. Travaux antérieurs sur les HE du genre *Eucalyptus*

Les HE du genre *Eucalyptus* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Nous avons classé ces huiles en fonction de leurs compositions. Nous avons distingué trois groupes principaux. Le premier groupe comprend les huiles à cinéole seul avec un pourcentage qui dépasse 70% (Les pourcentages des composants minoritaires sont <5%) ; le deuxième groupe comprend les huiles à cinéole et α -pinène et le troisième groupe est représenté par les huiles sans cinéole où on assiste à la prédominance d'autres chémotypes comme composants majoritaires au lieu du composant monoterpénique classique, 1,8- cinéole.

Seuls les composants majoritaires (ayant une teneur supérieure à 5%) sont mentionnés dans ces tableaux.

D'après le tableau II.1 qui montre les composants majoritaires (% > 70) d'HE à cinéole seul: on remarque que la composition chimique des HE de cinq espèces différentes (*E. viridis*, *E. oleosa* [10], *E. sideroxyl* et *E. salubris* [11] *E. globulus* [12-15]), prélevées des zones très éloignées géographiquement (Californie, Brésil, Maroc et Iran), est remarquablement riche en oxyde monoterpénique, 1,8 cinéole qui reste dans la plupart des cas un marqueur spécifique caractérisant les HE de ce genre à travers le monde. Les autres composants constituant ces huiles sont minoritaires avec un pourcentage inférieur à 5%, ce qui offre un label à ces huiles d'être des produits à chémotype cinéole et qui restent très recommandés par les utilisateurs en industrie pharmaceutique et cosmétique [16], surtout si leur teneur en phéllandrène est inférieure à 1%.

L'analyse chimique de ces huiles révèle non seulement une constance dans la composition qualitative mais aussi une constance au niveau de la composition quantitative, en effet les pourcentages sont très proches, oscillant entre 72.9 et 89.9%, ce qui traduit que la présence de variations relativement faibles de la composition pour la même espèce ou entre espèces poussant dans des régions différentes ne traduirait pas forcément un effet direct du facteur écologique.

Tableau II.1: Composants majoritaires (% > 70) d'HE (à cinéole seul) du genre *Eucalyptus*

Composé (%)	% du 1,8 cinéole (>70%)							
	Espèces et Origines							
	<i>E.oleosa</i>	<i>E.viridis</i>	<i>E.sideroxylon</i>	<i>E.salubris</i>	<i>E.globulus</i>			
	Iran [10]	Maroc [11]		Brésil [12]	Brésil [13]	Maroc [14]	Californie [15]	
1,8 cinéole	89,4	84,7	80,9	72,9	89,9	83,9	82,0	86,7

Le tableau II.2, représente les Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE à cinéole et α -pinène, on remarque que les HE de cette série d'espèces sont constituées d'un mélange de produits : Les oxydes monoterpéniques et les monoterpènes hydrocarbonés sont les constituants majoritaires de ces huiles, des terpènes et des sesquiterpènes hydrocarbonés.

Toutes les huiles de cette série se composent du 1,8-cinéole et α -pinène avec des taux qui varient respectivement entre (9,5 - 69,5%) et (5,3 - 28,3%).

Le 1,8- cinéole, reste aussi le marqueur spécifique pour ces huiles prélevées de plusieurs pays du monde, présentant des variations plus ou moins importantes ; le taux le plus faible (9,5%) est celui d'*E.camaldulensis* de la Chine [16]; en revanche cette même espèce cultivée au Maroc [17, 18] présentait des taux plus élevés pour deux régions différentes (42,3 et 48,8%) (Tableau II.3).

Cependant le taux le plus élevé (69,5%) de ce produit actif est celui d'*E. radiata* du Maroc [19], suivi par un taux de 63.5% de l'huile prélevée de l'Argentine [20].

Les huiles restantes montrent des taux moyens et intermédiaires, par rapport à celles citées précédemment.

L' α -pinène est le deuxième composant majoritaire où on assiste à des variations quantitatives intra- et inter-espèces plus ou moins importantes ; les quantités sont inférieures à celles du 1.8-cinéole pour la majorité des cas, excepté au niveau d'*E.cladocalyx* (23.1% contre 13.7%) du Maroc [18] et (22.5% contre 9.5%) pour l'espèce *E.camaldulensis* de la Chine [16].

Les molécules suivantes, aromadendrène, limonène, α -fenchyl acetate, α -terpinéol, *p*-cymène, viridiflor, γ -cadinène, γ -terpinène, α -terpinyl acetate et α -phellandrène ont été aussi rapportées au niveau de ces huiles avec des teneurs plus ou moins appréciables, au sein de l'espèce, ou entre les espèces.

Tableau II.2: Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE (à cinéole et α -pinène) du genre *Eucalyptus*

Composé (%)	HE (à cinéole et α -pinène) (> 5.0 %)					
	Espèces et Origines					
	<i>E.camaldulensis</i> Chine [16]	<i>E.globulus</i> Argentine [20]	<i>E.microtheca</i> Nigeria [21]	<i>E.urophylla</i> Taiwan [22]	<i>E.oleosa</i> Australie [23]	<i>E. viridis</i> Australie [23]
1,8 cinéole	9,5	63,5	53,8	58,3	52,0	43,9
α -pinène	22,5	13,7	6,8	6,3	24,7	5,3
α -fenchyl acetate			5,4			
α -terpinéol			5,6			
γ -terpinène	9,4					
viridiflor		5,45				
aromadendrène						18,3
α -phellandrène	20,1					
γ -cadinène			5,0			
α -terpinyl acetate				14,9		

Tableau II.3 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE (à cinéole et α -pinène) du genre *Eucalyptus* du Maroc.

Composé (%)	HE (à cinéole et α -pinène) (> 5.0%)			
	Espèces (Origines)			
	<i>E.camaldulensis</i> [17]	<i>E.camaldulensis</i> [18]	<i>E. cladocalyx</i> [18]	<i>E. radia</i> [19]
1,8 cinéole	42,3	48,7	13,7	69,5
α -pinène	28,3	7,9	23,1	11,9
p-cymène	6,5		16,3	
γ -terpinène	7,3	7,7		

Les tableaux II.4 et II.5 montrent les composants majoritaires (% > 5.0) d'HE sans cinéole du genre *Eucalyptus* du Brésil [13, 24] et autres pays ; l'analyse de la composition chimique

indique la présence d'autres marqueurs spécifiques qui diffèrent du 1,8 cinéole, on définit de ce fait plusieurs profils chimiques en fonction du composant majoritaire.

Des chimiotypes particulièrement riches en α -pinène (73%), β -citronellal (71.7%), *p*-cymène (54.2%) et pipéritone (40.5%), prélevées respectivement de quatre espèces (*E. robusta*, *E. saligna*, *E. citriodora* et *E. dives*) du Brésil.

L' α -pinène et le *p*-cymène sont aussi les composants majoritaires des HE prélevées d'*E. grandis* du Nigéria [21], d'*E. globulus* de Taiwan [25], d'*E. camaldulensis* de Floride du sud [25] et d'*E. tereticornis* du Bénin [26]. Les teneurs oscillent entre 21.4 et 30.4% pour l' α -pinène et entre 21.6 et 31.4% pour le *p*-cymène.

L'*E. camaldulensis* d'Espagne [27] est caractérisé par le spathulénol, avec un pourcentage de 41,4 suivi par le *p*-cymène (21,7%).

On assiste aussi à un autre chimiotype à β -pipène de l'espèce *E. tereticornis* de Nigeria (39.4%) [21] et qui se caractérise aussi par la présence de phéllandrène avec un pourcentage de 5.0%, une teneur qui diminue considérablement l'efficacité de cette huile et son utilisation au niveau pharmaceutique.

On note pour l'espèce *E. globulus* de Taiwan [22], est particulière par rapport aux autres huiles, elle est marquée par la co-dominance de l' α -pinène (22,5 %), de *p*-cymène (21,7 %) et d' α -phéllandrène (20,1 %)

Tableau II.4 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE (sans cinéole) du genre *Eucalyptus* de Brésil

HE (sans cinéole) de Brésil [13, 24]				
Espèces				
Composants %	<i>E. robusta</i>	<i>E. saligna</i>	<i>E. citriodora</i>	<i>E. dives</i>
α -pinène	73.0			
β -citronellal			71.7	
<i>p</i> -cymène		54.2		8.5
Pipéritone				40.5
α -phéllandrène				17.4
γ -Isopulegol			7.3	

Tableau II.5 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE (sans cinéole) du genre *Eucalyptus*

HE (sans cinéole) (% > 5.0)						
Espèces et origines						
	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i>	<i>E. globulus</i>	<i>E. camaldulensis</i>	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. camaldulensis</i>
Composé(%)	Nigeria [21]	Nigeria [21]	Taiwan [22]	Floride du sud [25]	Benin [26]	Espagne [27]
α -pinène	21.4	30.4	22.52			
<i>p</i> -cymène			21.6	35.0	31.4	21,9
β - pinène	39.4					
β -phéllandrène	5.0		20.08		9.77	
γ -terpinène					7.03	
cryptone				13.7		7,7
α -phéllandrène					6.78	
Limonène	8.0					
Spathuléol					8.13	41,4
terpinène-4-ol		10.7		5.7		
β -ocimène		9.4				
bornéol		8.4				
cis-terpinéol		8.0				

II.7. Description de nos travaux d'extraction et d'analyse GC et GC/MS de l'espèce *Eucalyptus globulus*

II.7.1. Matériel végétal

Il faut savoir que cet arbre est exotique car il est introduit en Algérie vers 1856 par Ramel de l'Australie. Il forme beaucoup de bois dans la partie nord de pays. Les feuilles fraîches de cet arbre ont été récoltées dans la région de Constantine.

C'est un très grand arbre qui peut atteindre des hauteurs considérables 30 mètre « même jusqu'à 80 m pour son pays d'origine », l'écorce du gommier bleu pèle en larges bandes. Les feuilles des arbres juvéniles apparaissent par paires sur des tiges carrées. Elles mesurent de 6 à 15 cm de long et sont couvertes d'une pruine cireuse bleu-gris, qui est à l'origine du nom de « gommier bleu ». Les feuilles des arbres matures sont alternes, étroites, en forme de faux et d'un vert foncé luisant. Elles poussent sur des tiges cylindriques et mesurent de 15 à 35 cm de long. Les boutons floraux en forme de toupie sont côtelés et recouverts d'un opercule aplati portant un bouton central. Les fleurs couleur crème sont solitaires à l'aisselle des feuilles et produisent un abondant nectar que les abeilles transforment en un miel à saveur prononcée. Les fruits ligneux mesurent de 1,5 à 2,5 cm de diamètre ont une capsule très dure. De nombreuses petites graines s'échappent par des valves qui s'ouvrent sur le dessus du fruit.

Odeur : forte, fraîche, balsamique « odeur d'une baume », camphrée.

Saveur : chaude aromatique, un peu amère, suivie d'une sensation de fraîcheur prononcée et agréable.

Biotope : très cultivé sur le littoral dans l'air de l'oranger, il préfère les terrains humides. Le but, c'est d'assainir les régions marécageuses. Comme il est planté fréquemment en bordures de routes et forme beaucoup de bois dans la partie nord de pays.

Récolte : en Février et en Novembre à la taille des arbres.

Partie à utiliser : essentiellement par ses feuilles adultes poussant sur les rameaux âgés.

II.7.2. Classification dans la systématique botanique

Synonymes : Gommier bleu, *Eucalyptus globuleux*, Arbre à fièvre, *Eucalyptus officinal*.

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida - Dicotylédones

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Eucalyptus*

Espèce : *globulus*

Nom botanique : *Eucalyptus globulus*, Labill.

Les noms vernaculaires : Calitouss « le nom le plus connue en Algérie », Calibtus, Kafor. Ces noms sont les plus populaires en Algérie qui sont appelés dans plusieurs différentes régions.



Figure II.1: Photographie d'*Eucalyptus globulus*, Labill.

II.7.3. Propriétés thérapeutiques d'*Eucalyptus globulus*

L'HE d'*Eucalyptus globulus* est un antiseptique des voies respiratoires, expectorant, analgésique [28], en usage interne et externe, décongestionnant, hypoglycémiant, une action détoxifiante des toxines diphtérique et tétanique, antimicrobien sur les bactéries Gram +, antifongique, anti-inflammatoire, améliore les épreuves fonctionnelles respiratoires, mucolytique, antispasmodique bronchique, fébrifuge, tropisme broncho-pulmonaire très marqué, asséchante en forte proportion.

Les propriétés médicinales de l'*Eucalyptus* sont surtout attribuables à l'eucalyptol (aussi appelé 1,8-cinéole) que renferment ses feuilles. Le 1,8-cinéole que contient l'*Eucalyptus* s'est révélé être efficace pour réduire la dose de corticostéroïdes utilisée par des sujets souffrant d'asthme [29] et pour combattre le rhume [30, 31].

II.7.4.Extraction

100 g de feuilles fraîches d'*Eucalyptus globulus* sont hydrodistillés dans un Clevenger, durant 3h. L'HE obtenue (2,5 %), de couleur jaune et d'odeur agréable, est conservée à + 4°C. jusqu'à son analyse par GC/MS.

II.7.5. Analyse GC et GC/MS

***Analyse GC**

L'analyse GC a été effectuée sur un chromatographe Finnigan SSQ 7000. Colonne DB-5 (30 m x 0,25 mm i.d. épaisseur de film 0,25 mm). Le gaz vecteur est l'Helium avec un taux de : 1ml/min, la température de la colonne est de 40 à 250°C à une vitesse de 3°C min⁻¹, La température de l'injecteur et du détecteur est à 280°C, le volume injecté est 0,1 ml ; rapport split : 1 :10.

***Analyse GC/MS**

L'analyse GC a été effectuée sur un appareil Finnigan SSQ 7000 équipé d'une colonne de DB-5 (30 m x 0,25 mm i.d. épaisseur de film 0,25 mm). Les paramètres MS étant :

- Température de trappe d'ions : 200°C
- Rapport split : 1 :10
- Potentiel d'ionisation : 70°C ev
- Courant d'ionisation : 2A
- Bande de scan : 40-400 u
- Temps de scan : 1s

Les composants de l'HE ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention (RI) relatifs aux n-alcanes C9-C17 et à leur MS avec les données (Librairies NIST et WILEY) correspondantes ainsi qu'aux spectres données par la littérature [32-34].

Le pourcentage relatif aux composés identifiés a été calculé à partir de la GC par intégrateur informatisé.

II.7.6. Résultats et discussion de l'analyse GC/MS

Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'élution dans la colonne, sont résumés dans le tableau II.6.

Tableau II.6: Composition de l'HE d'*Eucalyptus globulus*

Composants	IR ^a	%
α -Pinène	930	9.7
1,8-cinéole	1030	48.6
Isoamyisovalerate	1100	1.1
<i>trans</i> -Pinocarveol	1151	10.7
Pinocarvone	1165	1.0
4-Terpineol	1179	0.3
α -Terpineol	1192	6.6
<i>trans</i> -Carveol	1220	0.8
Carvacrol	1286	0.1
α -Terpinyl acetate	1327	0.3
Geranyl acétate	1389	0.1
Aromadendrène	1435	4.6
Ledene	1480	0.6
Viridiflorol	1532	0.4
Globulol	1593	10.9
α -Eudesmol	1646	0.8
Juriper Camphor	1655	0.6
Isoaromadendrene oxide	1695	0.2
6, 6-Dimethyl-2-(3-oxobuyl)-bicyclo [3, 11] heptan-3-one	1742	0.2
Carboxamide	1770	0.7

IR^a : Indice de rétention obtenu sur une colonne DB-5MS utilisant des séries homologues de n-alcanes.

20 composés, représentant 98,3% de l'HE d'*Eucalyptus globulus* ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de 1,8-cinéole (**48,6%**), α -pinène (9,7%) globulol (10,9 %), *trans*-pinocarveol (10,7 %) et α -terpineol (6,6%).

Ces composés ont déjà été identifiés comme constituants des HE d'*Eucalyptus*.

La prédominance d'oxyde terpénique 1,8- cinéole est en accord avec les résultats obtenus pour les huiles du même genre (à cinéole) dont les composants majoritaires sont rassemblés dans les tableaux II.1, II.2, II.3: Le pourcentage de **48,6** du cinéole est comparable à celui de l'huile d'*E. viridis* : 1,8-cinéole (**43.8%**), α -pinène (5.2%), aromadendrène (18.3%) et aussi à celui de l'huile d'*E. oleosa* : 1,8- cinéole (**52.0%**), α -pinène (24.7%). Ces deux huiles ont été prélevées d'Australie en 1995 [23].

Elle présente aussi une similitude avec l'huile d'*E. camaldulensis* : 1,8- cinéole (**42,3%**), α -pinène (28,3%), *p*-cymène (6.5%), γ -terpinène (7.3%) prélevée du Maroc en 2011 [17].

L'analyse chimique révèle aussi une autre constance dans la composition qualitative, au niveau de l' α -pinène de l'huile étudiée et ces trois HE, mais laisse apparaître des différences sur le plan quantitatif : Dans notre cas, l'huile présente un pourcentage de (**9,7%**) qui est donc supérieur à celui de l'huile d'*E.viridis* (**5.2%**), remarquablement inférieur à celle d'*E. oleosa* (**24.7%**) d'Australie [23] et inférieur aussi à celle d'*E. camaldulensis* (**28,3%**) du Maroc [17].

En revanche, notre huile présente une différence au niveau des composants majoritaires restants par rapport à ces trois huiles : c'est la présence d'un sesquiterpénol, globulol (10,9 %), une valeur proche de celle trouvée au niveau de la même espèce *E. globulus* prélevée en Allemagne en 2010, avec une teneur de (10.7%) [35]. L'huile diffère aussi par la présence de *trans*-pinocarvéol avec un pourcentage de (10.7%).

La composition chimique de l'huile a été comparée avec des huiles de la même espèce (*E. globulus*) prélevées de plusieurs pays, les composants majoritaires sont rassemblés dans le tableau II.7.

Le 1,8- cinéole reste le composé majoritaire de la plupart des HE analysées de la même espèce: sa teneur varie entre 14.5 et 83.8% ; notre échantillon prélevé de la région de constantine présente une teneur de cet oxyde de (48,6%), c'est une valeur moyenne intermédiaire entre celles des espèces figurées sur le tableau II.7.

Les échantillons provenant de Brésil [13], Chine [16] et Argentine [20] sont remarquablement plus riches en 1,8- cinéole, le taux de ce principe actif présente des variations relativement importantes d'une espèce à une autre, où les valeurs oscillent entre **63.4 et 83,8%**, pour cela les HE d'*E. globulus* sont très demandées ; le marché de ces produits est estimé à environ 1.500 tonnes/an [10].

Notre huile diffère par sa composition de celle extraite des feuilles de la même espèce cultivée en Allemagne [35] dont le constituant majoritaire c'est l'aromadendrene (31.1 %), suivi par le 1,8 cinéole (14.5%) et le globulol (10.6%). On note une similitude au niveau de la teneur en globulol (10.9 %) pour notre cas.

Notons aussi une deuxième similitude au niveau de la teneur en α -pinène (9.2%) pour l'espèce de la Chine [16].

D'autres constituants ont été trouvés à des taux relativement importants, il s'agit du limonène (17.8%) pour l'espèce récoltée en Inde [36] et de l' α -pinène (13.7%) pour l'espèce se trouvant en Argentine [20].

La composition chimique de l'HE d'*E. globulus* semble varier éventuellement au sein de la même espèce et d'un milieu à un autre et elle est sujette à de nombreuses variations ; plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de ces variations: l'âge des feuilles[29, 34], celui de l'arbre [37], la partie de la plante soumise à l'extraction [38-40], le degré de séchage du matériel végétal avant distillation [41] et la période de récolte [37], la nature du sol et du climat [42, 43], l'influence de ce dernier facteur a été observée dans le cas de plusieurs espèces.

En effet, ces huiles ont été récoltées dans des pays de climats différents, dont chacun présente ses propres caractéristiques pluviométriques et édaphiques. La divergence observée au niveau de la composition chimique des HE, peut être la résultante d'une différence des niveaux de biosynthèse des enzymes intervenant dans la formation des monoterpènes. L'implication de facteurs héréditaires dans ce processus n'est pas à exclure, sachant que la composition des HE d'*Eucalyptus* est généralement influencée par des facteurs génétiques [44].

La connaissance de la composition chimique des HE, que ce soit majoritaires ou minoritaires, est d'un intérêt capital pour la suite de notre travail, dans la mesure où elle nous permettra de justifier l'efficacité antimicrobienne de nos produits testés et de comparer leur potentiel thérapeutique en fonction de leur profil chimique.

Tableau II.7 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE (à cinéole) de l'espèce *Eucalyptus globulus*

HE (à cinéole) (% > 5.0)							
Origines							
Composé(%)	Brésil [13]	Chine [16]	Argentine [20]	Allmagne [35]	Inde [36]	Algérie [45]	Maroc [46]
1,8 cinéole	83.8	72.7	63.4	14.5	45.4	48.6	22.3
α -pinène		9.2	13.7			9.7	
aromadendrène				31.1			
β -pinène							5.2
<i>p</i> -cymène					9.5		
γ -terpinène					8.8		
limonène	8,1				17.8		7.0
viridiflor			5.3				
globulol				10.6		10.9	
<i>trans</i> -pinocarvéol						10.7	
α -terpinyl acetate		3.1					
solanol							6.0

Références bibliographiques

- 1- **Bruneton J., 1999.** pharmacognosy Phytochemistry medical plants Lavoisier publishing, USA, New York 2:a upplagan s. 555-558
- 2- **Goldstein, H.B., Epstein, B.J., 2000.** La dentisterie non conventionnelle : Parais 4, les pratiques et les produits dentaires conventionnels. J Can. Dent. Assoc.; 66: 564-568.
- 3- **Atta, AH., Alkofahi, A., 1998.** Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. J Ethnopharmacol, Mar; 60 (2):117-24.
- 4- **Santos, F.A., Rao, VS., 2000.** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cinéole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytother. Res Jun; 14(4): 240-244.
- 5- **Grassmann, J., Hippeli, S., 2000 .** Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. Arzneimittelforschung Feb; 50 (2):135-139.
- 6- **Baudoux, D. 2001.** L'aromathérapie-Se soigner par les huiles essentielles, Atlantica, 132-133.
- 7- **Tesche, S., Metternich, F., 2008.** The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis. Results of a double-blind, randomised, controlled trial. Eur. Arch. Otorhinolaryngol.Nov; 265(11):1355-1359
- 8- **Meister, R., Wittig, T., 1999.** Efficacy and tolerability of myrtol standardized in long-term treatment of chronic bronchitis. A double-blind, placebo-controlled study. Study Group Investigators. Arzneimittel forschung Apr; 49 (4):351-8.
- 9- **Kamal, M., Tantaoui, El.A., Ismaili, A.M., 1997.** Etude du pouvoir anti- fongique des fumées de feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis*. Plantes médicinales et aromatiques et leurs huiles essentielles. Actes Editions.
- 10- **Jaimand, K., Rezaee, N.H.B., 2009.** Volatile Oil Constituents of the *Eucalyptus viridis* R. T. Baker and *Eucalyptus oleosa* F. Muell. Leaves from Iran.J. Med. Plants, 8 (5): 105-108.
- 11- **Zrira, S., El-Khiran F. Benjlilal, B., 1994.** Huiles essentielles de six espèces xérophyles d'*Eucalyptus*: Effet du milieu sur les rendements et la composition chimique. Actes Inst. Agron. Veto (Maroc), 14 (1): 5 – 9.
- 12- **Georgia R.V., Gustavo, S. A., Marisa, A.B., Regitano, D., Maria, H., Duarte, M., Jose, O.B., Maria, F., Sebastião, C.S., Soônia, M.S.P., Maria Antonia, C.D., Eduardo, M. G., 2009.** Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. J. of Stored Products Res. 45: 108–111.

- 13- Maciel, M.V., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Silva, R.A., Barros, R.S., Sousa, R.N., Sousa, L.C., Brito, E.S., Souza-Neto, M.A., 2010.** Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*, *Veterinary Parasitology* 167, 1–7.
- 14- Chennoufi, R., Morizur, J.P., Richard, H., Sandret, F., 1980.** Étude des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* du Maroc. (Feuilles de jeunesse et feuilles adultes). *Riv. Ital.* 62 (7), 353-357.
- 15- Agric, J., 1979.** Essential oil of *Eucalyptus globulus* in California. *Food Chem.*, 27 (2): 432–435.
- 16- Sen-Sung, Ch., Chin-Gi, H., Ying-J.Ch., Jane-Jane, Y., Wei-June, Ch., Shang-Tzen Ch., 2009.** Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Biores.Technol.*100: 452–456.
- 17- Hmiri, Sh., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M., El Ajjouri, M., 2011.** Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*E. camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80: 824 - 836
- 18- Abdellah, F., Mohamed, F., Abdelaziz, Ch., 2002.** Effet de l'hybridation interspécifique sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus* cultivés au Maroc *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6 (3): 163–169.
- 19- Bendaoud, H., Bouajila, J. Rhouma, A. Savagnac, A. Romdhane, M., 2009.** GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. Acte de congrès international sur les plantes aromatiques et médicinales, 26-27 et 28, Marrakech, Maroc.
- 20- Gende, L., 2010.** Antimicrobial and miticide activities of *Eucalyptus globulus* essential oils obtained from different Argentine region, *Span J Agric.* 8 (3), 642-650
- 21- Isiaka, A., Ogunwande, N.O., Olawore, K.A., Adeleke W.A.K., 2003.** Chemical Composition of the Essential Oils from the Leaves of Three *Eucalyptus* Species Growing In Nigeria, *Technol. J. of Essent. Oil Res.*
- 22- Chen, S., Huang, C., Chen, Y., Yu, J., Chen, W., Chang, S., 2009.** Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species, *Biores. Technol.*, 100: 452-456.

- 23-Bignell, C.M., Dunlop, P.J., Brophy, J.J., Jackson, J.F., 1995.** Volatile leaf oils of some South-western and Southern Australian species of the genus *Eucalyptus*. Part V. subgenus symphyomyrtus, section bisectaria, series oleosae, Flav. and Fragr. J.; 10 (5): 313 – 7.
- 24-Patricia, S., Marquioreto, A.D., Amaral-Baroli, A., Marcos, E.L.L., Moreno, P.R.H., 2007.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. Phytother. Res., 2: 231-233.
- 25- Robert, S., Pappas, 2011.**The Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. From South Florida: A High Cryptone/Low Cineole *Eucalyptus*. Essential Oil University Site Map| Privacy Statement.
- 26-Guy, A., Félicien, A., Valentin, D. W., Edwige A.D.J., Dominique, C.K. 2003.** Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. Comptes Rendus Chimie, 7 (10-11): 1051-1055.
- 27- Verdeguer, M., Blazquez, M. A., Boira, H., 2009.** Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops, Biochem. Syst. Ecol., **37** : 362-369.
- 28- Duraffourd, C., lapraz, J-C. 1997.** Les règles d'utilisation des huiles essentielles en thérapeutique. Edition Phyto. 2000.
- 29- Juergens, UR., Dethlefsen, U., 2003.** Anti-inflammatory activity of a 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. Respir. Med. 97: 250, 256.
- 30- Tesche, S., Metternich, F., 2008.** The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis. Results of a double-blind, randomised, controlled trial. Arch. Otorhinolaryngo. 1265 (11):1355-1359.
- 31- Kehrl, W., Sonnemann, U., Dethlefsen, U., 2004.** Therapy for acute nonpurulent rhinosinusitis with cineole: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Laryngoscope. 114 (4):738-742.
- 32- Adams, RP., 2007.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed., Allured, Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
- 33- Mclafferty, FW., Stauffer, DB., 1991.** The important peak index of the registry of mass spectral data. John Wiley and Son, New York.
- 34- Swigar, AA., Silverstein, RM., 1981.** Monoterpenes-infrared, mass, proton-NMR, carbon-NMR spectra and Kovats Indices. Aldrich Chemical Company Inc., Madison.

- 35- Mulyaningsih, S., Frank, S., Stefan, Z., Jurgen, R., Michael, W., 2010.** Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cinéole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomed.* V.17, Issue 13 (11): 1061-1066.
- 36- Amit, K.T., Anushree, M., 2011.** Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126 (1): 228-235.
- 37- Zrira, S., 1992.** Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* du Maroc. Facteurs influençant la productivité et la qualité de ces essences. Investigation sur les possibilités d'exploitation d'*E.camaldulensis* pour la production d'huile essentielle d'*Eucalyptus* à cinéole. Thèse de Doctorat Univ. Hassan II-Rabat, Maroc.
- 38- Baslas, R.K., Saxena, S., 1984.** Chemical examination of essential oil from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. *Herb. Hung.* 23: 21-23
- 39- Yataga, i M., Takahachi, T., 1984.** Essential oil and successive extractives of *Eucalyptus* leaves. *Biomass* 4: 305-310.
- 40- Zrira, S., Benjlali, B., 1991 (a).** The essential oil of the leaves and the fruits of *E. camaldulensis*. *J. Ess. Oil Res.* 3 (6): 443-444.
- 41- Zrira, S. Benjlali, B. 1991(b).** Effect of drying on leaf oil production of Moroccan *E. camaldulensis*. *J. Ess. Oil Res.* 3 (2) : 117-118.
- 42- Hajji, F., El Idrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Bellakhdar, J. 1989.** Étude des compositions chimiques de quelques espèces d'*Eucalyptus* du Maroc. *Al Biruniya, Rev. Mar. Pharm.* 5 (2): 125-132.
- 43-Sandret, F.G., 1967.** *Eucalyptus globulus* et *E. cineorifolia* pour la production d'huiles essentielles au Maroc. *Annales de la recherche forestière au Maroc* 9, rapport 1965, 259-279.
- 44-Gilles, M., 2008.** Isolement et caractérisation chez l'*Eucalyptus* de gènes codant les facteurs de transcription *CBF* impliqués dans la réponse au froid. Thèse de Doctort de l'université de Toulouse.
- 45- Daroui-Mokaddem, H., Kabouche, A., Bouacha, M., Soumati, B. El-Azzouny, A., Bruneaud, Ch. Kabouche, Z., 2010.** GC/MS Analysis and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Fresh Leaves of *Eucalytus globulus*, and Leaves and Stems of *Smyrniium olusatrum* from Constantine (Algeria). *Nat. Prod. Commun. (NPC)* 5 (10): 1669- 1672.
- 46- Derwich, E., Benziane, Z., Boukir, A., 2009.** GC/MS Analysis of Volatile Constituents and Antibacterial Activity of the Essential oil of the Leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Nat. and Appl. Sciences*, 3 (3): 305-31

III. Description de nos travaux sur l'espèce *Smyrniium olusatrum*

III.1. Présentation botanique et géographique de la famille des *Apiaceae* (Apiacées)

La famille des *Apiaceae*, appelées anciennement Ombellifères (*Umbelliferae*), est une famille de plantes dicotylédones. Selon Watson et Dallwitz, elle comprend près de 3 000 espèces réparties en 420 genres et sont surtout présentes dans les régions tempérées du monde. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle [1].

III.2. Intérêt biologique de la famille des *Apiaceae*

Dans les ombellifères se trouvent de nombreuses plantes utiles pour l'homme :

- des légumes-racines - Carotte (*Daucus carotta*), Panais (*Pastinaca sativa*), Cerfeuil tubéreux (*Chaerophyllum bulbosum*)...
- des légumes-feuilles/tiges - Céleri (*Apium graveolens*), Fenouil (*Foeniculum vulgare*)...
- des herbes aromatiques - Cerfeuil (*Anthriscus cerefolium*), Persil (*Petroselinum crispum*), Ngo gai (*Eryngium foetidum L.*), Coriandre (*Coriandrum sativum*)...
- des épices-graines - Cumin (*Cuminum cyminum*), Anis (*Pimpinella anisum*), Coriandre (*Coriandrum sativum*)
- des sources de résines odorantes - asafoetida (*Ferula asafoetida*)
- mais aussi de nombreuses médicinales et des plantes toxiques (Ciguë).

III.3. Présentation botanique et géographique du genre *Smyrniium*

Le genre *Smyrniium* regroupe 8 espèces de la famille des *Apiaceae* : *S. olusatrum*, *S. perfoliatum L.*, *S. rotundifolium Mill.*, *S. cordifolium*, *S. connatum*, *S. creticum*, *S. peregrinum* et *S. integerrimum*.

Ce genre est peu étudié, l'espèce *Smyrniium perfoliatum L.* reste pour le moment la mieux investie par rapport aux autres [2, 3, 4, 5].

Le *Smyrniium olusatrum* est originaire des régions méditerranéennes : Afrique du Nord : Maroc, Algérie, Tunisie [6]; Europe méridionale : Grèce, Italie, ex-Yougoslavie, France, Portugal, Espagne ; Asie occidentale : Turquie, Chypre, Palestine, Liban, Syrie. Le nom latin *Smyrniium* vient du grec *Smyrna* (smyrre) et le nom d'espèce " *Olusatrum* " signifie légume noir.

Cultivé en France, dans les jardins de monastères et des châteaux pendant quinze siècles, du début de l'ère chrétienne jusqu'au 18^{ème} siècle [7], les tiges cuites, et les jeunes pousses aussi

bien que les racines crues et cuites étaient consommées en tant que légumes [3], en plus le maceron était consommé pour sa racine tubérisée à la manière de la carotte, ou pour sa feuille, donnée comme ayant des propriétés antiscorbutiques [7].

L'herbe était cultivée partout dans l'Europe [3]. La fin du 18^{ème} siècle marque le déclin du Maceron auquel se substituera le céleri définitivement. Aujourd'hui en Europe aucune forme cultivée du Maceron n'existe [8]. Cependant, dans certaines régions de Libye, les jeunes pousses cultivées de cette plante sont encore utilisées pour la préparation de certaines salades et elles sont aussi utilisées en Palestine pour ses propriétés antiscorbutiques [9].

III.4. Composition chimique du *Smyrniium olusatrum*

Les tiges, les feuilles, les fleurs et les racines de cette plante ont été étudiées pour leur contenu en flavonoïdes, composés phénoliques, et surtout les sesquiterpènes et l'HE (contenant β -phellandène, limonène, α -pinène).

III.5. Travaux antérieurs sur les HE du genre *Smyrniium*

Plusieurs études ont été réalisées dans le but de déterminer les constituants des HE obtenues à partir des tiges, des feuilles, des fruits, des racines et des fleurs d'espèces *Smyrniium* et qui sont énumérés dans les tableaux, III.1- III.4.

Le tableau III.1 représente les composants majoritaires > 5% des HE prélevées à partir des feuilles et des tiges pour des espèces différentes : *S. olusatrum*, *S. perfoliatum* et *S. cordifolium* où on assiste à la présence de sesquiterpènes oxygénés ; des furano-sesquiterpènes et des monoterpènes hydrocarbonés.

L'aromadendrène est le composant prédominant pour l'espèce *S. perfoliatum* (**49.9%**) ; pour l'espèce *S. olusatrum*, furanodienne + furanoéllène (46%) caractérisant l'huile Algérienne récoltée à Tlemcen [10], le germacrene D prédomine, avec une teneur de **45.2%** dans l'HE d'Allemagne et le furanoeremophil-1-one (**54.3%**), suivi par le curzerène (18.8%), constituants majoritaires de l'huile récoltée en Grèce [11]. Par ailleurs, ce dernier constituant, avec le curzerénone, représentent les composants majoritaires de l'HE de l'espèce *S. cordifolium* récoltée en Iran [8] avec des teneurs respectives de 22.7 et 19.2%.

L'huile des feuilles et des tiges est pourvue aussi de β -phéllandène, furanodiène, myrcène et sofuranogermacrène avec des quantités qui varient d'une manière plus ou moins appréciable d'une espèce à une autre.

Tableau III.1 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE d'espèces *Smyrniium* (Feuilles + tiges)

Espèces et origines						
Composé (%)	<i>S. perfoliatum</i>		<i>S. olusatrum</i>			
	Iran [2]		Allemagne [3]	Grèce [11]	Italie [12]	Angleterre [13]
aromadendrène	49.9					
germacrone					8.0	
germacrène B					10.0	
germacrène D			45.2			
neryl isovalérate	10.2					
furanoeremophil-1-one				54.0		9.5
acide hexadécanoïque		13.6				
1 β -acetoxyfuranoeudesm-3-ene			9.04			
isofuranogermacrène						18.8
β -phéllandrène					9.0	24.9
β -caryophyllène					12.0	
curzerène		22.7		18.8	12.0	
curzerenone		19.2				
limonène						6.6
myrcène					14.0	5.80
furanodiène					17.0	16.02

Le tableau III.2 montre une constance au niveau de la composition chimique qualitative et quantitative : Germacrène D (45,2%) pour l'huile des fruits de *S. perforatum* prélevée de deux pays différents : Iran et Allemagne [3, 8]. Une teneur similaire (45.7%) en curzerène, suivie de curzénone (23.9%) caractérise l'huile des fruits de *S.cordifolium* d'Iran [8]. Les chimiotypes de l'espèce *S. olusatrum* présentent des chémotypes apparemment différents avec des concentrations moins importantes, 30.8% pour le 1 β -acetoxyfuranoeudesm-4(15)-ene prédominant dans l'huile de Grèce [11] et (26.9%) de β -phéllandrène dans celle d'Angleterre [13].

On remarque dans le tableau III.3, représentant les composants majoritaires de la partie souterraine (racines), que le curzénone est présent avec un pourcentage plus important (56.6%) chez l'espèce *S. cordifolium* [2] par rapport aux huiles citées précédemment. On note aussi la présence d'un monoterpène hydrocarboné α -pinène (39.3%) dans l'huile de *S. perfoliatum* ; une co-existence d'isofuranogermacrène (20.5%) et de β -phéllandrène (20.3%) et une présence caractéristique de limonène (11.7%) dans l'huile de *S. olusatrum* d'Angleterre

[13]. L'huile de la même espèce prélevée d'Italie [12] est mieux pourvue de β -phéllandrène (34.1%).

Tableau III.2 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'HE d'espèces *Smyrniium* (fruits)

Espèces et origines					
Composé(%)	<i>S. cordifolium</i>	<i>S. perforatum.</i>	<i>S. olusatrum</i>	<i>S. perforatum.</i>	
	Iran [2]		Allemagne [3]	Grèce [11]	Angleterre [13]
α - pinène					12.4
germacrène D		45.2	45.2		
1 β - acetoxym-furano- sm-4(15)-ene				30.8	
isofuranogermacrène					5.9
β -phéllandrène					26.9
Curzerène	45.7			17.4	
Curzénone	23.9				
Myrcène					10.8
Furanodiène					5.3

Tableau III.3 : Composés majoritaires (% > 5.0) d'HE d'espèces *Smyrniium* (Racines)

Espèces et origines				
Composé(%)	<i>S. perfoliatum</i>	<i>S. cordifolium</i>	<i>S. olusatrum</i>	
	Iran [2]		Italie [12]	Angleterre [13]
α -pinène	39.3			
germacrone			8, 7	
germacrène B			7, 14	
aromadendrène	13.2			
Acide hexadécanoïque		18.7		
isofuranogermacrène				20.51
α -terpinyl valerate	10.0			
β -phéllandrène		18.7	34, 17	20.35
curzerène			13, 6	
curzénone		56.6		
limonène				11.81
furanodiène			19, 8	17.13

Le tableau III.4 représente les composés majoritaires > 5% des huiles prélevées des fleurs de l'espèce *S. olusatrum* d'Angleterre [13] et de Grèce [11]: On note des variations quantitative et qualitative au niveau de la composition chimique des deux huiles, celle de Grèce [11] se compose de trois produits dont les concentrations se rapprochent, germacrène (20.2%), le furanoeremophil-1-one (20.0%) et curzénone (18.1%). En revanche, L'huile d'Angleterre [13] est pourvue d'autres constituants, la concentration la plus importante est celle d'isofuranogermacrène (28.3%), suivie par le furanodiène (19.3%).

Tableau III.4: Composés majoritaires (% > 5.0) d'HE d'espèces *Smyrniium olusatrum* (Fleurs)

Origines		
Composé(%)	Grèce [11]	Angleterre [13]
germacrone	20.2	
furanoeremophil-1-one	20.0	
curzerène	18.1	
isofuranogermacrène		28.31
α -phéllandrène		5.01
β -phéllandrène		16.34
myrcène		12.39
furanodiène		19.38

III.6. Description de nos travaux

III.6.1. Matériel végétal

Les feuilles et les tiges fraîches de cette plante ont été récoltées dans la région de Constantine en Mai 2006 ; la plante a été identifiée par le professeur Gérard De Belair (Université d'Annaba). Un échantillon est conservé dans l'herbier du laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (LOST) au département de chimie, Constantine, sous le code : ZKLOST So05/06.

III.6.2. Classification dans la systématique botanique

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Sous- embranchement : Angiospermes

Classe : dicotylédones

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Smyrniium*

Espèce : *Smyrniium olusatrum* L. [6]

III.6.3. Description de la plante

C'est une plante herbacée bisannuelle, à tige vigoureuse, creuse à l'intérieur, cannelée longitudinalement, qui peut atteindre 1,5 m de haut.

Les feuilles, opposées, de couleur vert clair, de relativement grande taille, sont composées, à folioles larges et dentelées. Celles de la base sont complètement divisées trois fois. Les feuilles supérieures n'ont que trois folioles.

Les fleurs, vert-jaunâtre, sont groupées en ombelles composées, à involucre peu développé. Les fruits ont 4-5 mm de long à maturité et sont noirs. La racine, charnue, est du type pivotant. Période de floraison (Avril jusqu'à juillet), le fruit est de type : Akène [8].



Figure III.1 : Photographie de *Smyrniolus atrum* en période de floraison.

III.6.4. Extraction

200 g de feuilles fraîches de *Smyrniolus atrum* sont hydrodistillés dans un Clevenger, durant 3h. L'HE obtenue (1,2%), de couleur jaune et d'odeur agréable, additionnée à l'anhydride de sulfate d'ammonium et conservée à + 4°C. jusqu'à son analyse par GC/MS.

III.6.5. Analyse GC et GC/MS.

L'analyse GC et GC/MS a été effectuée sur le même appareil et dans les mêmes conditions opératoires que la plante *E. globulus* étudiée précédemment.

III.6.6. Résultats et discussion de l'analyse GC/MS

33 composés, représentant 94,3% de l'HE de *Smyrniolus atrum* ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de sabinène (27.1%), curzerène (13.7%), méthyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane, carboxylate (12.3%), α -pinène (7.2%), cryptone (7.1%) et β -pinène (5.7%). Le composant majoritaire est le monoterpène cyclique, Sabinène ; donc notre huile est un chimiotype à sabinène.

Il apparait que notre huile étudiée est différente de celle de Tlemcen, constituée de furanodiène + furanoéène (46%), furanoeremophillone (12.2%), *trans*- caryophyllène (6.3%) et β -pinène (6.3%) [10].

On assiste uniquement à une seule ressemblance au niveau du β -pinène, les valeurs sont proches (5.7 et 6.3%). On peut expliquer la différence des compositions des huiles essentielles de la plante récoltée à Tlemcen et à Constantine par la différence géographique et climatique.

Les tableaux montrent aussi que notre huile se caractérise par la présence de sabinène, méthyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane et cryptone par rapport à celles prélevées de l'Italie et de l'Angleterre, représentées par furanodiène (8,17%), germacrène B (7,14%) et germacrone (7,8%).

Les composés obtenus, listés selon leur ordre d'élution dans la colonne, sont résumés dans le tableau III.5.

Tableau III.5 : Composition de l'HE de *Smyrniium olastratum* récoltée à Constantine

Compound	IR	%
α -Pinène	930	7.2
Sabinène	979	27.1
β -Pinène	985	5.7
Limonène	1031	0.4
α -Terpinolène	1089	0.5
Linalool	1100	0.6
Octenyl acétate	1120	0.3
Cryptone	1186	7.1
α -Terpinéol	1192	0.3
<i>p</i> -Cymèn-8-ol	1199	0.3
Cuminic aldehyde	1248	0.9
Phéllandral	1284	2.1
2-Caren-10-al	1295	0.3
Citronellyl acetate	1330	0.1
Geranyl acétate	1389	0.1
Geosmin	1400	0.2
γ - Elemène	1420	1.0
Curzerène	1490	13.7
γ -Cadinène	1511	0.3
δ -Cadinène	1524	0.6
1, 5-epoxysalvial-4(14)-ene	1541	0.4
Caryophyllène oxide	1585	0.4
β -Eléménone	1600	0.6
β -Guaïene	1605	0.8
T-Cadinol	1618	0.1
δ -Cadinol	1643	1.5
α -Cadinol	1654	0.5
Germacrone	1683	0.9
Isoaromadendrène oxide	1695	1.5
2,4-dicyclohexylbuten-3-yne	1706	0.8
Furoscrobiculin B	1775	3.2
Methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane	1910	12.3
Carboxylate		
Tricosane	2300	2.7

IR^a: Indice de rétention obtenu sur une colonne DB-5MS utilisant des séries homologues de n-alcanes.

Références bibliographiques

- 1-**Watson, L., Dallwitz, M.J., 1991.** The families of angiosperm: Automated descriptions, with interactive identification, and information retrieval. *Aust. Syst. Bot.*, 4: 681-695.
- 2-**Amiri, H., Ramezan, A., Khavari, N. Masoudi, Sh. Chalabian, F. Rustaiyan, A. 2006.** Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Stems, Leaves, Fruits and Roots of *Smyrniium cordifolium* Boiss. from Iran; *The J.of Essent.Oil Res.*, 18: 574-577.
- 3-**Molleken, U., Sinnwell, V., Kubeczka, K.H., 1998.** The essential oil composition of fruits from *Smyrniium perfoliatum*. *Phytochemistry*. 47: 1079-1083.
- 4- **Tirillini, B.B., Stoppini, A.M., 1996.** The essential oil composition of fruits from *Smyrniium perfoliatum*. *J.of Essent.Oil*, 8: 611-614.
- 5- **Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana 1991, IXed.** Istituto Poligrafico Zecca dello Stato, Rome.
- 6-**Quezel, P., Santa, S. 1963.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS (Ed.), Paris. Tomes. 1-2.
- 7-**Mathon, C.C., 1986.** Potagères autrefois répandues et aujourd'hui disparues. Suggestions pour une typologie. *JATBA*, 121-126.
- 8-**Julve, P., 2004.** écologique et chorologique de la flore de France. *Baseflor*. Index botanique.version: 23.
- 9- **Jafri, S.M.H., El-Gadi, A., 1985.** Flora of Libya, Al Faatkeh University, Faculty of Science Publication, Tripoli vol. 117.
- 10- **Mohammedi, Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, thèse pour l'obtention du diplôme de Magistère en biologie. Univ. Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.
- 11-**Fotini, P., Aikaterini, K., Tzakou, O., 2010.** Volatile constituents of different parts of *Smyrniium olusatrum* from Greece, *Nat. product commun.*, 11, 2010; 5 (11): 1809-10.
- 12- **Bertoli, A., Pistelli, L., Morelli, I., Fraternali, D., Giamperi, L. Ricci, D., 2004.** Volatile constituents of different parts (roots, stems and leaves) of *Smyrniium olusatrum* L. *Flav. and Fragr. J.*19: 522-525.
- 13- **Molleken, U., Sinnwell, V., Kubeczka, K.H., 1996.** Ess. oil composition of *Smyrniium olusatrum*, *Phytochemistry*. 49 (6) : 1709-1714.

Introduction

L'évolution rapide des bactéries pathogènes vers la multirésistance aux antibiotiques est une des motivations essentielles à la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. De nombreux travaux antérieurs étaient focalisés sur la mise en évidence de pouvoir anti – microbien de plantes médicinales. Ceux dont l'efficacité contre les micro-organismes pathogènes ont été prouvés, trouvent des applications pratiques dans divers domaines. Les HE constituent les extraits les plus largement exploités.

L'Algérie de part sa situation géographique et son climat exceptionnel, abrite un grand nombre de plantes médicinales et aromatiques dont la plupart est exploité dans des conditions artisanales et marginales par rapport aux modalités modernes de production et de valorisation. Ainsi, avec le regain d'intérêt que connaissent les plantes à l'échelle internationale, plusieurs voix commencent à se faire entendre en faveur d'études en profondeur de nos plantes locales dans le but de rechercher des substances naturelles actives pour une éventuelle lutte biologique contre les infections microbiennes.

A cet effet, nous nous sommes engagés à étudier l'effet antimicrobien des HE d'*Eucalyptus globulus* et *Smyrniium olusatrum*, afin de vérifier si leur pouvoir antiseptique est aussi important que celui des espèces étudiées ailleurs et également si la variabilité de la composition chimique influence l'activité antimicrobienne de ces essences. Pour ce faire, nous avons subdivisé notre travail en :

- Etude du comportement des bactéries isolées vis-à-vis des antibiotiques ;
- Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique des deux huiles ;
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles en déterminant :
 - ✓ Les diamètres de la zone d'inhibition
 - ✓ Les concentrations minimales inhibitrices
 - ✓ Les concentrations minimales destructives (bactéricides et fongicides)

IV. Description des travaux d'étude de l'activité antimicrobienne des HE d'*Eucalyptus globulus* et *Smyrniun olusatrum*

IV.1. Méthodologie

L'étude de l'activité antimicrobienne des deux huiles a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie du département de Biochimie- Université Badji-Mokhtar, Annaba, sur les souches bactériennes suivantes : *Bacillus rhuriniensis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter, freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Providencia alcalifaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Les souches fongiques : *Aspergillus niger*, *Candida albicans* et *Penicillium chrysogenum*.

IV.2. Matériel microbiologique

Nous avons choisi de travailler sur une gamme de microorganismes afin de donner une idée sur l'étendu du champ d'activité antimicrobienne de nos produits.

Les souches bactériennes et le germe fongique *Candida albicans* employés proviennent de l'institut Pasteur et de prélèvement de malades du C.H.U.- Annaba.

Les souches fongiques *Aspergillus niger* et *Penicillium chrysogenum* ont été prélevées du lac Oubaira-Elkala, Eltarf.

Les souches microbiennes ont été identifiées au département de Biochimie, université Badji-Mokhtar, Annaba.

IV.3. les milieux de culture

Le milieu de Mueller- Hinton et Sabouraud solides ont été utilisés dans la détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI et Les concentrations minimales destructives (bactéricides et fongicides) CMD des souches microbiennes vis-à-vis des témoins et des HE.

IV.4. Préparation des suspensions de micro-organismes

Les suspensions de micro-organismes sont préparées à partir des bouillons d'enrichissement des différentes souches incubées pendant 24 heures, à 37°C pour les bactéries, et à 30°C pour les levures. A 9 ml d'eau physiologique stérile, on ajoute 100 µl du bouillon.

Pour les champignons, les suspensions sont préparées à partir d'une culture de 10 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu Sabouroud. Elle est préparée dans de l'eau physiologique contenant du Tween 80 et ajustée à 10⁵ UFC (unité formant colonie)/ml par comptage sur une cellule de Mallassez.

IV.5. L'Antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode de disques)

IV.5.1. Définition de l'Antibiogramme

L'Antibiogramme est un examen de laboratoire permettant d'apprécier la sensibilité d'une bactérie prélevée chez un malade vis-à-vis de divers antibiotiques [1].

La technique utilisée dans notre travail est la technique NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standart) [2]. Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non. Dans notre étude les souches bactériennes utilisées sont des bactéries non exigeantes.

Les conditions techniques suivantes doivent être respectées :

- Milieu

- Pour les bactéries, le milieu standard utilisé est le Mueller-Hinton, c'est un milieu standardisé selon les normes de l'OMS, c'est-à-dire d'une manière telle qu'il permet la croissance de nombreuses bactéries.

Pour les germes fongiques le milieu standard utilisé est le Sabouroud.

- L'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4 mm répartie uniformément.
- Les boîtes sont pré-séchées avant l'emploi [3, 4].

- Préparation des disques

Nous avons utilisé le papier Wattman N°3 coupé en disques de 6 mm de diamètre. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à essai contenant 10 ml d'eau distillée et autoclavés 20 mn à 120° C [4].

IV.5.2. Méthode

***Inoculum**

- L'inoculum doit être de 2 à 3. 10⁶ bactéries pour obtenir des colonies confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement. Puis on racle cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- On décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- On homogénéise la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à des DO de 0.08 à 0.1 lue à 625 nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum [3].

Pour les champignons, avec un disque d'environ 2 mm découpé dans un tapis mycélien de préculture, disposé au centre de la boîte de Pétri, face supérieure contre le nouveau milieu de culture, soit par nappage de la surface du milieu gélosé, d'une suspension de 10^5 conidies/ml.

***Ensemencement**

- On trompe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ou fongique.
- On l'essore en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche de haut en bas, en stries serrées.
- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, on recharge l'écouvillon à chaque fois.
- Préparation des dilutions utilisées pour l'antibiogramme (même dilution utilisées pour la CMI).

Application immédiate des disques [3].

***Pré-incubation**

Les boîtes sont laissées pendant 15 mn à température ambiante (sur la paillasse) [3].

***Incubation**

Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48h pour la levure et les moisissures.

***La lecture**

L'action du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du disque. Pour chaque disque, on mesure avec précision le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle.

Un produit est considéré actif, s'il donne un diamètre d'inhibition ≥ 15 mm.

Une fois l'antibiogramme est réalisé et les diamètres d'inhibition sont mesurés, on passe à la deuxième étape de l'étude de l'activité antimicrobienne ; il s'agit de la détermination de CMI [3].

***Témoins**

Des contrôles sont réalisés simultanément pour chaque essai ; Pour se faire, on utilise trois antibiotiques (tétracycline, gentamycine et amoxicilline) et un antifongique (Nystatine) comme contrôle positif.

On teste également le DMSO à la dilution ayant servi à solubiliser tous les produits actifs, comme témoin négatif.

IV.5.3. Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

*Définition

On peut définir la CMI par la concentration minimale inhibitrice ou bien la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber dans un milieu (Soit milieu liquide ou solide), toute culture visible de la souche étudiée [4, 5].

* Réalisation

Préparer une solution mère (γ) de concentration de 2000 $\mu\text{g/ml}$ en utilisant 20 mg de l'HE et en ajoutant du DMSO (20%) jusqu'à 10 ml.

A partir de cette solution mère, on réalise les différentes dilutions selon le tableau suivant :

Tableau IV.1: Les différentes dilutions de la solution mère [6,7]

Concentration initiale en $\mu\text{g/ml}$	Volume en ml	Volume d'eau distillée en ml	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$
2000	6.4	3.6	1280
1280	2 1 0.5 0.5	2 3 3.5 7.5	640 320 160 80
80	2 1 0.5 0.5	2 3 3.5 7.5	40 20 10 5
5	2 1 0.5 0.5	2 3 3.05 7.5	2.5 1.25 0.63 0.32

Pour avoir la concentration de 1280 $\mu\text{g/ml}$ à partir de la solution de 2000 $\mu\text{g/ml}$, on prend 6.4 ml de cette dernière à laquelle on ajoute 3.6 ml d'eau distillée.

*Procédé

- On prépare une culture en phase exponentielle en milieu liquide de la bactérie à étudier.

- On repique 0.1 ml (bacille à Gram négatif), 0.3 ml (*Staphylocoque*, *P. aeruginosa*) de la culture de 18 heures dans 120 ml de bouillon de Mueller-Hinton (ou autre bouillon adéquat pour la bactérie à étudier).
- On met à l'étuve à 37°C pendant 3 à 5 heures, jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence.
- On ajoute 1 ml de ce bouillon à 10ml de bouillon M-H, préalablement chauffé à 37°C.
- On met 2 ml de chaque dilution de la gamme de l'extrait déjà préparé dans une boîte de Pétri, en allant de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible.
- On ajoute 18 ml de la gélose M-H chauffé à 45°C, bien mélangée aux boîtes de Pétri.
- On laisse les boîtes pendant 30 mn à l'étuve à 37°C.
- On ensemence en strie, à l'aide d'une anse de platine ou à pipette rodée, sur toutes les boîtes contenant l'HE sans oublier la boîte témoin.
- On incube les boîtes pendant 18 h. à 37°C [6, 7].

***Lecture**

On lit les concentrations minimales inhibitrices (CMI) : Concentration d'antibiotique (HE de chaque plante pour notre cas) pour laquelle il n'ya pas de culture microbienne visible [6, 7].

IV.5.4. Détermination de la CMD (bactéricides CMB et fongicides)

La CMD a été définie comme la plus faible concentration d'antibiotique qui détruit 99.9% de l'inoculum microbien, ce qui correspond dans notre étude à un dénombrement inférieur à 10^4 à 10^2 UFC/ml après 24 heures d'incubation (l'inoculum initial est entre 10^6 et 10^8 UFC/ml) [8]. Un volume de 0,1ml de tous les tubes qui ne montrent pas de turbidité est subcultivé sur un milieu de gélose nutritif et incubé à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La concentration minimale destructive (CMD) correspond à la plus petite concentration d'antibiotique pour laquelle aucune croissance n'est observée [8, 9] (Figure IV.1).

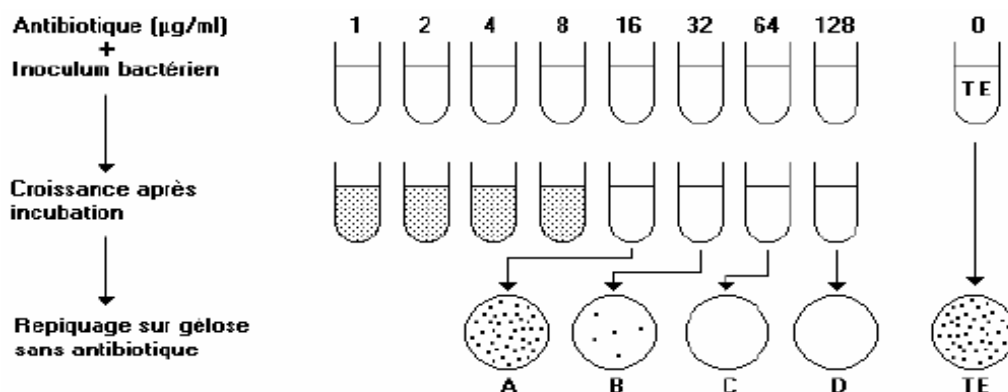


Figure IV.1: Recherche de Concentration Minimale Bactéricide (40)

IV.6. Détermination de l'activité antibactérienne et antifongique

Après 24 h. d'incubation à 37°C, on a récupéré les boîtes et on a mesuré les diamètres des zones d'inhibition par addition des témoins (Antibiotiques, Nystatine), des HE d'*Eucalyptus globulus* et du *Smyrniium olusatrum* sur les différentes souches bactériennes et fongiques testées, les résultats obtenus sont dressés dans les tableaux suivants.

IV.6.1. Résultats de l'antibiogramme des témoins

La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques) qui permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques [10, 11].

Tableau IV.2 : Zones d'inhibition en mm en présence d'antibiotiques.

ATB	Tetracycline (30µg)		Gentamycine (10 UI)		Amoxicilline + acide Clavulanique (20/10 µg)	
	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats
<i>Citrobacter freundii</i>	19	S	30	S	-	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	R	27	S	-	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20	S	27	S	25	S
<i>Escherichia coli</i>	25	S	30	S	-	R
<i>Proteus mirabilis</i>	-	R	27	S	13	R
<i>Providencia alcalifaciens</i>	-	R	22	S	-	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12	R	22	S	-	R
<i>Bacillus rhurinziensis</i>	35	S	33	S	21	S
<i>Bacillus subtilis</i>	12	R	-	R	-	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19	S	27	S	-	R

R : Résistant ; S : Sensible

Selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM), le choix des antibiotiques testés sur les différentes espèces

bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique (Voir tableau 18) [10].

Tableau IV.3: Spectre d'activité des antibiotiques utilisés

Famille d'antibiotique	Groupe d'antibiotique	Antibiotique	Code d'antibiotique	Charge du disque	Diamètre de la zone d'inhibition	
					S	R
β-lactame	Pénicilline	Ampicilline	AM	30 µg	≥19	< 14
		<i>Amoxicilline</i>	AMX	25 µg	≥21	< 14
		Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	20/ 10 µg	≥21	< 14
Aminosides	s/g : gentamycine	Gentamicine	GM	10 µg	≥16	< 14
	Tétracycline	Doxycycline	DO	30 µg	≥19	< 17
Tétracycline		Tétracycline	TE	30 µg	≥19	< 17

Tableau IV.4: Zones d'inhibition en mm en présence de Nystatine

	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium chrysogenum</i>		<i>Candida albicans</i>	
	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats
Nystatine (25 µg/ml)	33	S	22	S	14	I

I : Intermédiaire ; S : Sensible

IV.6.2. Détermination de l'aromatogramme, la CMI et la CMD de l'HE d'*E. globulus*

Tableau IV.5 : Zones d'inhibition en mm, CMI et CMD de l'HE d'*E. globulus*

Souches microbiennes	Diamètre en mm (1mg /ml)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMD ($\mu\text{g/ml}$)	DMSO
<i>Citrobacter freundii</i>	12	80	-	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	>40	-	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	>40	-	R
<i>Escherichia coli</i>	20	20	-	R
<i>Proteus mirabilis</i>	18	40	-	R
<i>Providencia alcalifaciens</i>	12	>80	-	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20	80	-	R
<i>Bacillus rhurinsiensis</i>	32	10	10	R
<i>Bacillus subtilis</i>	R	-	-	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16	>40	160	R
<i>Aspergillus niger</i>	R	-	-	R
<i>Candida albicans</i>	15	>160	640	R
<i>Penicillium chrysogenum</i>	18	160	-	R

R : Résistant

IV.6.3. Détermination de l'aromatogramme, la CMI et la CMD de l'HE de *S. olusatrum*

Tableau IV.6: Zones d'inhibition en mm, CMI et CMD de l'HE de *S. olusatrum*

Souches microbiennes	Diamètre en mm (1mg /ml)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMD ($\mu\text{g/ml}$)	DMSO
<i>Citrobacter freundii</i>	R	-	-	R
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12	>80	-	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	R	-	-	R
<i>Escherichia coli</i>	R	-	-	R
<i>Proteus mirabilis</i>	R	-	-	R
<i>Providencia alcalifaciens</i>	10	160	-	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20	>80	-	R
<i>Bacillus rhurinsiensis</i>	25	20	-	R
<i>Bacillus subtilis</i>	13	80	-	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25	20	-	R
<i>Aspergillus niger</i>	18	160	-	R
<i>Candida albicans</i>	15	>160	-	R
<i>Penicillium chrysogenum</i>	12	320	-	R

IV.7. Discussion des résultats

Les essais de criblage du pouvoir antimicrobien ont été réalisés par la méthode de diffusion sur gel. D'après les résultats obtenus, l'HE d'*E. globulus* semble jouir d'une activité inhibitrice particulièrement large sur les différentes classes de micro-organismes testés excepté pour *Bacillus subtilus*. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 12 et 32 mm.

Les niveaux de sensibilité des bactéries vis-à-vis des deux types d'essences sont relativement proches à l'exception de *Citrobacter freundii* et *Enterobacter aerogenes* dont les diamètres d'inhibition sont plus faibles, 12 et 15mm respectivement, cependant la souche *Bacillus rhurinziensis* présente un diamètre plus élevé, 32 mm.

Les bactéries à Gram positif montrent des zones d'inhibition supérieures à celles observées chez les bactéries à Gram négatif et ce dans les deux chimiotypes.

Par comparaison avec les antibiotiques, tétracycline, gentamycine et amoxicilline utilisés comme témoins, les HE manifestent une action inhibitrice plus prononcée. Les souches ayant montré une résistance à l'action des antibiotiques sont vulnérables à l'action des deux types d'essences, c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia alcalifaciens*, *Enterobacter aerogenes* et *Bacillus subtilus*.

Chez les espèces fongiques, la levure *Candida albicans*, a manifesté une activité inférieure par rapport à la moisissure *Penicillium chrysogenum*. Les zones d'inhibition respectives sont comprises entre 15 et 18 mm et ce pour l'huile d'*E. globulus* : On note pour ce cas, la résistance de la souche fongique *Aspergillus niger*.

Pour l'huile de *S. olusatrum*, les zones d'inhibition pour les trois souches fongiques varient entre 12 et 18 mm, *Aspergillus niger* montre une zone d'inhibition supérieure aux autres.

On a pu déterminer le diamètre d'inhibition des huiles mais on ne peut pas se fier seulement à cette technique pour trancher définitivement de la supériorité du pouvoir antiseptique d'une essence par rapport à une autre. A l'origine de ce constat, le manque d'une bonne reproductibilité de la technique, un avis partagé par plusieurs auteurs ayant utilisés cette même méthode pour étudier le pouvoir antimicrobien des essences naturelles [12].

La quantification de l'effet inhibiteur des deux HE par détermination des CMI et des CMD, semble être le moyen le plus convenable pour comparer l'efficacité de nos essences entre elles.

Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition ont un rapport avec les valeurs de CMI recherchées, c'est à dire que les bactéries ayant les diamètres de la zones d'inhibition les plus élevés sont celles qui possèdent les CMI les plus faibles, et les bactéries ayant les diamètres les plus faibles sont celles qui donnent les CMI les plus élevées.

Les CMI et les CMD des deux essences ont été déterminées par la méthode de diffusion sur gel. Pour le chimiotype d'*E. globulus*, les CMI sont comprises entre 10 et 80 µg/ml pour les souches bactériennes ; *Bacillus rhurinsiensis* et *E. coli* possèdent les CMI les plus faibles, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, et *Staphylococcus aureus* gravitent autour d'une même de 40 µg/ml.

Citrobacter freundii et *Providencia alcalifaciens* présentent une valeur similaire de 80µg/ml. La même valeur de CMI a été montrée par la souche *Pseudomonas aeruginosa*, apparemment elle ne concorde pas avec la valeur prometteuse de diamètre d'inhibition (20 mm), ceci s'explique par la nature de la paroi qui confère toujours une certaine résistance à cette souche vis-à-vis des agents antibactériens. En moyenne, les bactéries à Gram positif ont des CMI deux fois supérieur que cette souche à Gram négatif.

Les valeurs de CMI pour les champignons gravitent autour d'une même valeur de 160 µg/ml.

Par comparaison avec l'huile d'*E. globulus*, l'huile de *S. olusatrum* apparaît moins active.

En effet, quatre bactéries sur dix sont résistantes à cette huile. La souche *Providencia alcalifaciens* possède la valeur de CMI la plus élevée (>160 µg/ml), tandis-que les souches *Bacillus rhurinsiensis* et *Staphylococcus aureus* présentent les valeurs de CMI les plus faibles et qui concordent bien avec les valeurs de leurs zones d'inhibition (20 mm).

On note des CMI inférieures pour les germes fongiques par rapport aux bactéries.

L'activité antimicrobienne de l'HE de *S. olusatrum* récoltée à Tlemcen, caractérisée par la présence du furanodienne + furanoélémente (46%), β-pinène (6.3%), furaneremophillone (12.2%) et trans-caryophyllène (6.3%) [38], semble différente de celle décrite ici.

En effet, les diamètres d'inhibition sont remarquablement faibles, ils varient entre 0 et 3,33 mm, les mêmes souches testées sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Candida albicans*.

Concernant les CMD de l'essence d'*Eucalyptus*, les souches microbiennes semblent plus résistantes, 8 bactéries sur 10 testées ont des CMD nulles, les bactéries Gram positif, *Bacillus rhurinsiensis* et *Staphylococcus aureus* sont détruites à des concentrations respectives de (10 et 160 µg/ml), la valeur bactéricide semble quatre fois plus grande que la valeur de CMI de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* et aussi pour la souche fongique *Candida albicans*. Pour l'huile du *S. olusatrum*, les CMD des souches fongiques sont aussi nulles, donc une résistance relativement importante à la destruction, même pour la levure *Candida albicans*,

de toutes les manières, il a été rapporté que les HE sont souvent fongistatiques plutôt que fongicides [13].

Les CMI et les CMD des deux types d'essences présentées ci-dessus sont obtenues avec une moyenne d'au moins trois expérimentations indépendantes.

A partir des résultats de l'analyse chimique des deux huiles ; on a pu mettre en évidence une variabilité au niveau de la composition chimique, donnant naissance à deux chimiotypes à deux chémotypes différents.

La variabilité quant à la sensibilité des microorganismes à l'action des différents types d'essences, serait liée à la nature chimique de leurs composants majoritaires.

A la lumière des CMI et des CMD, il ressort que le chimiotype à cinéole est de loin le plus actif.

Selon la classification de Franchomme, les aromates de nature phénoliques sont les plus actifs, l'ordre d'efficacité ainsi établi est le suivant :

Phénol/ Alcool/ Cétone / Ether/hydrocarbure [14].

La comparaison du pouvoir antibactérien et antifongique des huiles de nature phénolique avec d'autres essences montre une meilleure activité antibactérienne conformément à la classification de Franchomme. En effet, la limonène premier intermédiaire cyclique dans la biosynthèse des monoterpènes oxygénés [15, 16] ne possède pas de double liaison extracyclique entre le C4 et le C7. La présence de cette liaison chez le pulégone augmente son pouvoir anti-microbien.

De même, comparé à l'oxyde de pipériténone, l'oxyde de pipéritone ne possède pas cette liaison et présente une activité généralement inférieure à celle de pulégone et de l'oxyde de pipériténone. Cette double liaison semble d'une grande importance du fait qu'elle permet d'augmenter le potentiel antimicrobien de ces monoterpènes [39].

Les résultats montrent aussi une sensibilité notable des bactéries à Gram positif par rapport aux souches à Gram négatif surtout pour l'essence de *Smyrnium*.

La différence de sensibilité des microorganismes renseigne sur un éventuel effet membranaire de ces essences. La paroi des bactéries à Gram négatif, serait moins perméable aux agents antimicrobiens en raison de sa structure complexe. La couche externe, formée de polysaccharides, de protéines et de lipides agirait comme une barrière à l'entrée de différents agents chimiques [18].

Le pouvoir antimicrobien observé chez les HE peut être attribué à l'action isolée ou conjuguée des molécules qu'elles renferment.

Dans le chapitre précédent, nous avons pu mettre en évidence la composition chimique des deux essences, ainsi les composants majoritaires ont pu être identifiés.

Le chimiotype d'*Eucalyptus globulus* est composé de 1,8-cinéole (**48,6%**), α -pinène (9,7%) globulol (10,9 %), *trans*-pinocarveol (10,7 %) et α -terpineol (6,6%).

Le chimiotype de *Smyrniium olusatrum* est composé de sabinène (27.1%), curzerène (13.7%), methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane (12.3%), α -pinène (7.2%), cryptone (7.1%) et β -pinène (5.7%).

La majorité de ces composants sont des monoterpènes qui sont connus par leur célébrité d'activité antimicrobienne ; de plus les monoterpènes cycliques en raison de leurs caractères lipophiles ont de ce fait tendance à s'intégrer au niveau de la membrane cellulaire [19]. Ceci a pour conséquence une expansion de la membrane et une augmentation de sa fluidité, permettant ainsi un efflux plus au moins important des composants intra-cytoplasmiques, la mort microbienne s'en suit [20].

Il a été rapporté aussi que les monoterpènes possèdent des effets délétères sur les membranes mitochondriales et provoquent une inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial, ce qui entraîne des perturbations dans un large éventail des processus physiologiques et biochimiques dans la cellule [17].

Le pouvoir antimicrobien des composants majoritaires isolés ou associés confirment leur implication dans l'effet antiseptique de ces essences ; des essais *in vitro* rapportés par certains auteurs ont révélé un large spectre d'action aussi bien contre les bactéries Gram positif et négatif que contre les champignons, on citera à l'occurrence les effets synergiques et additifs des combinaisons suivantes: Limonène/1,8-cinéole [23] ; 1,8 cinéole/aromadendrène [24] ; cinnamaldéhyde/eugénol; thymol/ eugénol; carvacrol / eugénol et thymol / carvacrol [25, 26].

Les travaux de Chebli et al. [21] et de Vilela et al. [22] ont montré que la pulégone et le 1,8-cinéole purs provoquent une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que les HE dans leur totalité ; ainsi l'activité de l'HE est le résultat de ses composés majoritaires et aussi de l'effet synergique des composés minoritaires. [17].

L'effet d'antibiotique du 1,8-cinéole confère à l'HE dont elle a le composant essentiel son potentiel germicide vis-à-vis d'un grand nombre de bactéries ; on cite l'exemple de (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, et *Bacillus subtilis*) [27].

Une étude faite au Maroc, rapporte que les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* testées par l'HE d'*E. globulus*, ont présenté respectivement des zones d'inhibition de (48.15 et 13.50 mm) et des CMI de (0.15 et 0.75 mg/ml). [28]; ces valeurs sont proches à ceux décrits par d'autres chercheurs [29-31].

Ces résultats, apparemment, ne corroborent pas avec les notres, les deux souches sont plus vulnérables à notre essence et présentent des CMI plus inférieures (20 et 40 µg/ml), ceci est peut être attribué à la composition chimique de notre huile.

Les chimiotypes des deux huiles renferment des composants minoritaires qui peuvent potentialiser le pouvoir antimicrobien. Il s'agit principalement de :

L' α -pinène et le β -pinène, ces deux monoterpènes hydrocarbonés connus par leur potentiel antibactérien [32], agissent aussi sur les levures en inhibant les processus de transport d'ions, le processus de la respiration et en augmentant la perméabilité membranaire [33]. En plus, leurs énantiomères limonène et linalool possèdent une activité antibactérienne très remarquable [34-36].

L' α -terpinéol figure aussi parmi nos composants minoritaires, ce chémotype a prouvé dans certains travaux son efficacité antibactérienne, elle est 8 fois plus supérieure que celle de 1,8-cinéole [37], ceci fait penser que l'effet inhibiteur de ce chémotype a été conjugué à celui du 1,8-cinéole pour notre essence d'*Eucalyptus*.

Le globulol pourrait aussi potentialiser l'activité antimicrobienne ; en effet une étude récente rapportée par Mulyaningsih et al. [24] révèle des valeurs de CMI de (1 à 4 mg/ml) vis-à-vis des souches de streptocoques, *E. faecalis* et *A. baumannii*, en présence de ce chémotype.

Références bibliographiques

- 1-Dabena, H., 1997.** Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette, France, 500-502.
- 2- NCCL Standard for antimicrobial susceptibility testing by diffusion methods NCCLS.** 1985. Documents, 5:4.
- 3- Ericsson, H.M., Sherris, J.C., 1971.** Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl., 217, 1-90.
- 4- Le minor, L., Veron, M., 1989.** Bactériologie médicale. 2^{ème} édition. Ed. Flammarion. Paris.
- 5- Ferron, A., 1976.** Bactériologie médical à l'usage des étudiants en médecine. 8^{ème} édition. Ed. Groun et Roques, France.
- 6- Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargas, R., 1987.** Bactériologies médicales : techniques usuelles. Edition SIMEP (2^{ème} tirage), France.
- 7-Caurvalin, P., Flandrois, J.P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J. 1988.**
L'antibiogramme automatisé mpc-vigt, Paris.
- 8-Ganiere, J.P., Mangion, C., et Peridy, M., 2004.** Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacine, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines.
Revue Méd. vétérinaire.155 (8) : 411-416
- 9-Andrews, J.M., 2001.** The development of the BSAC standardization method of disc diffusion testing. JAC. Ed: British society for antimicr. Chemother. (48) S1: 29-42
- 10-Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Choutet, P., Courvalin, P., Debernath, H., Drugeon, H., Dubreuil, L., Goldstein, F.W., Jarlier, V., Lecleco, R., Nocolas-Chanoine, M.H., Phillipon, A., Quentin, C., Rouveux, B., Sirot, J., Soussy, C.J., 2007.** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.1-23.
- 11-François, S., 2000.** Les antibiotiques : Respecter les bonnes pratiques. Hygiène en milieu hospitalier. 30 : 8-13.
- 12-Benouda, A., Hassar, M., Benjilali, B., 1988.** Les propriétés antiseptiques des huiles essentielles *in vitro*, testées contre des germes pathogènes hospitaliers. Fitoterapia. 2: 115-119.
- 13-Moitie, J.O., Peciulyte, D., 2004.** Fungicidal properties of pinus sylvestris L. for improvement of a quality. Medicine (Kaunas). 40; 41 : 787-794.

- 14-Franchomme, P., Penoel, D., Mars, J., Jollois, R. 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstrations, illustrations et applications d'une science médicale naturelle. (Ed. jollois).
- 15-Kjonna, R., Croteau, R., 1983,** Demonstration that limonene is the first cyclic intermediate in the biosynthesis of oxygenated p-menthane monoterpenes in *Mentha piperita* and other menthe spies. Arch. biochem. Biophys. 220: 79-89.
- 16-Lange, MB., Wildung, MR., Einar, J. Stauber, EJ., Sanchez, C., Pouchnik, D., Coteau, R., 2000.** Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes. PNAS. 97: 62934-2939.
- 17-Shama, H., Mohamed, R., Zakaria, H., Badr, S., Mohamed, GH., Mustapha, E.L.A. 2011.** Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha Pulegium et d'Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. Bull. Soc. Royale des Sci.-Liège, Vol. 80: 824-836.
- 18-Russel, A. chopra, D. 1996.** Understanding antibacterial action and resistance. 2nd ed. Ellis Horwood, Chichester, England.
- 19-Grundy, DL., et Stille, CC., 1985.** Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide. Pesticide Biochem. and physiol. 23:383-388.
- 20-Sikkema, J., de Bont, J.A.M., boolman, B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J. of Bacter. 269: 8022-8028.
- 21- Chebli, B., Achouri, M., Idrissi, H.L.M., Hmamouchi, M., 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, J. Ethnopharmacol., 89: 165-169.
- 22- Vilela, G. R., Almeida, G. S., Regitano, D'arce M. A. B., Moraes, M. H.D., Brito, J. O. 2009.** Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare, J. Stored Prod. Res., 45: 108-111.
- 23- Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Özek, T., Demirci, B., Başer, K.H.C. 2007.** Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity. South African J. Botany 73: 441-448.

- 24- **Mulyaningsih, S., Frank, S., Zimmermann, S., Jürgen Reichling, Michael, W., 2010.** Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13):1061-1066.
- 25- **Iten, F., Saller, R., Abel, G., Reichling, J., 2009.** Additive antimicrobial effects of the active compounds of the essential oil of *thymus vulgaris*- chemotype carvacrol. *Planta Med.* 75: 1231-1236.
- 26- **Pei, R.S., Zhou, F., Ji, B.P., Xu, J., 2009.** Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.* 74: 379-383.
- 27- **Sivropoulou, A. Nicolaou, C., Papanikolaou, E., Dokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1997.** Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. of Agric. and Food Chemistry.*, 45: 3197-3201.
- 28- **Derwich, E., Benziane, Z., Taouil, R., Senhaji, O., Touzani, M., 2010.** Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco. *Amer.-Euras. J. of Sust. Agric.*, 4(1): 47-54.
- 29- **Raho Ghalem, B., Benali, M., 2008.** Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African J. of Pharmacy and Pharmacology* 2(10): 211-215.
- 30- **Trivedi, N.A., Hotchandani, S.C., 2004.** A study of the antimicrobial activity of oil of *Eucalyptus*. *Indian J. Pharmacol.* 36: 93-94.
- 31- **Gamal, A.M., Sabrin, R.M.I. 2007.** Eucalyptone G, a new phloroglucinol derivative and other constituents from *Eucalyptus globulus* Labill . *ARKIVOC Inter. J. Org. Chem.* : 281-291.
- 32- **Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308-316.
- 33- **Salvador, U., Ramirez, J., Pena, A., 1985.** Effects of β -pinen on Yeast membrane Functions. *J. of Bacteriology*, 161, No 3: 1195-1200.
- 34- **Magiatis, P., Melliou, E. Skaltsounis, A., Chinou, I., Mitaku, S., 1999.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. Chia, *Planta Med.*, 65: 749-752.

- 35-Koji, Y.K., Yamamoto, T., Kawai Y., Inoue, N., 2004.** Enhancement of antilisterial activity of essentials oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microb.*, 21: 283-289.
- 36-Filipowicz, N., Kamiński, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M. 2003.** Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components, *Phytoh. Res.*, 17: 227-231.
- 37- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., 2001.** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 565-573.
- 38- Mohammedi, Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, thèse pour l'obtention du diplôme de Magistère en biologie. Univ. Abou Bakr Belkaid-Tlemcen.
- 39- Oumzil, H., 2002.** Etude du spectre d'activité antimicrobienne et du mécanisme d'action des huiles essentielles de *Mentha suaveolens* EHRH. Thèse de Doctorat, Université Mohamed V-.Agdal, Maroc.
- 40.**http://pedagogie.acmontpellier.fr/Disciplines/sti/biotechn/documents/protocoles/Antibiogramme_en_milieu_liquide.htm

I.1. Généralités sur les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux [1]. Leur nombre est très important puisque l'on en connaît plus de 6500 structures qui ont été identifiées [2].

Plus ou moins hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. C'est le cas notamment des flavonoïdes jaunes dont font partie les chalcones, les aurones et les flavonols jaunes mais aussi des anthocyanosides qui peuvent être de couleur rouge, bleue ou violette. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration en jouant le rôle de co-pigments. Ces co-pigments sont notamment des flavones ainsi que des flavonols incolores. Certaines de ces molécules absorbent dans une zone proche de l'ultraviolet. La «coloration» de ces molécules n'est alors perçue que par les insectes qui, étant attirés par ces couleurs, vont permettre la pollinisation des végétaux et assurer ainsi la survie de l'espèce.

Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines [4], au niveau desquels ils assurent la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement solaire. On attribue à ces flavonoïdes d'autres propriétés variées: veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, anti-allergique, antispasmodique, anti-bactérienne, hépatoprotectrice, oestrogénique et/ou anti-oestrogénique, anti-virale etc... Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires.

I.1.1. Chimie des flavonoïdes

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6).

Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure I.1).

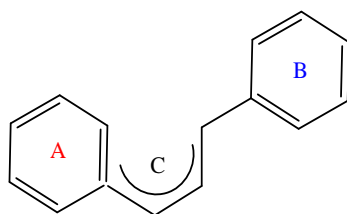


Figure I.1 : Squelette de base des flavonoïdes

I.1.2. Classes de flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées, nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols [3].

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles peuvent être méthylés, acétylés, phénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. La formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques [4].

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le D-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le D-galactose et le D-mannose, ainsi que des pentoses, le D-xylose, le L-arabinose et le D-apiose sont fréquents avec le L-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate [5].

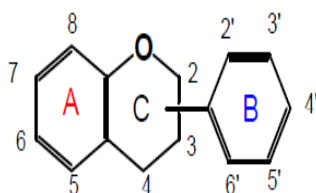


Figure I.2 : Différentes positions du cycle B sur Le cycle C

Dans la position 2, le flavonoïde est appelé flavane.

- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle, le flavonoïde est appelé flavanone.

- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé flavone.

- Si ce dernier est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de flavonol.

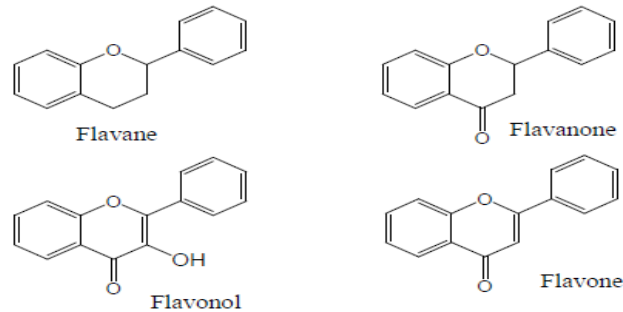


Figure I.3: Structure de base de principaux types de flavonoïdes

Dans la position 3, le flavonoïde est désigné par le terme isoflavane.

- Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement hydroxyle, le composé est désigné par le nom isoflavanol.

- Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement carbonyle, le composé est appelé isoflavanone.

- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de l'isoflavanone est insaturée le composé est nommé isoflavone.

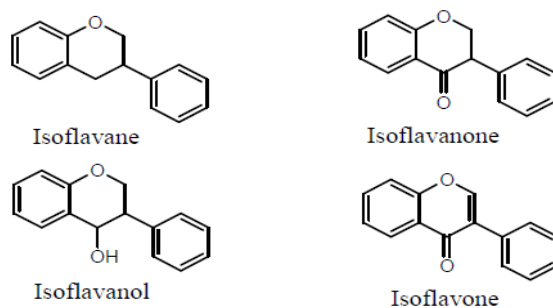


Figure I.4: Structure de base de principaux types d'isoflavonoïdes

Parmi ces différents types de composés isoflavoniques, les plus distribués dans le règne végétal sont les flavones. Ces derniers peuvent être classés en une douzaine de types structuraux différenciés par leur degré d'oxydation et par l'existence d'hétérocycles complémentaires.

Dans la position 4 avec un carbonyle en C-2 et une insaturation entre C-3 et C-4, le composé est dit néoflavone, ce type de composés est également appelé 4-aryl coumarine.

Par ailleurs, selon le degré d'hybridation des carbones de la chaîne en C-3 et le mécanisme de cyclisation de cette chaîne, on distingue d'autres squelettes flavonoïques telles que les chalcones, les dihydrochalcones et les aurones.

La figure I.5 résume les différents groupes et sous groupes dérivés des flavonoïdes

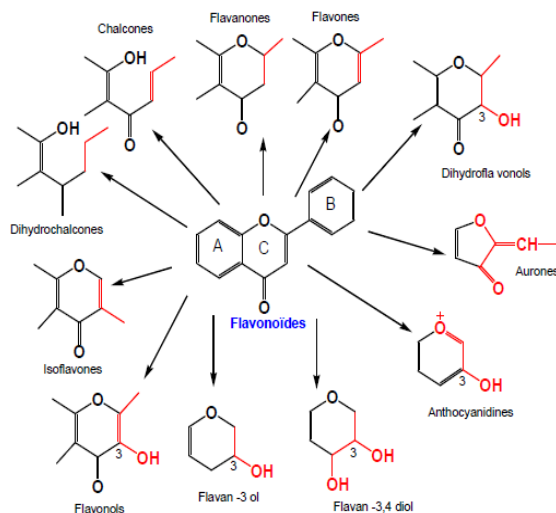


Figure I.5: Représentation des principaux groupes de flavonoïdes

I.2. L'activité antioxydante

L'oxygène moléculaire (O_2) est à la fois toxique et indispensable à la vie. L'Homme ainsi que tous les organismes aérobies le tolèrent car, en contrepartie, ce gaz permet, en tant qu'accepteur final d'électrons au niveau de leur chaîne respiratoire, de stocker de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). L'oxygène permet aussi de faire fonctionner certains systèmes enzymatiques. Toutefois, cette utilisation de l'oxygène entraîne la formation d'espèces chimiques extrêmement réactives que sont les radicaux libres oxygénés. Ces espèces oxygénées réactives (ROS) sont utiles mais peuvent devenir toxiques quand elles sont produites de manière excessive. Cette toxicité peut être aggravée, par la présence de façon naturelle dans l'organisme, de certains ions métalliques tels que le fer et le cuivre. Ces composés peuvent causer des dommages au niveau des «substrats oxydables» : des lipides qui sont un des éléments constitutifs essentiels des membranes cellulaires, des protéines et aussi au niveau des acides nucléiques présents dans la cellule et notamment l'ADN. C'est pour cette raison que notre organisme, lors de son

évolution, a développé en parallèle des systèmes de défense afin de le protéger contre cet effet toxique de l'oxygène [6].

Les défenses cellulaires antioxydantes peuvent être classées en deux types de défenses; les systèmes de défenses primaires et secondaires. Le système de défense primaire est constitué de systèmes enzymatiques spécifiques tels que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase ainsi que par une grande variété de petites molécules antioxydantes. Le système de défense secondaire est formé, d'une part par des enzymes lipolytiques et protéolytiques qui vont éviter l'accumulation de composés oxydés résultant d'une attaque radicalaire et d'autre part, par les systèmes de réparation de l'ADN [7].

Un antioxydant est toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou évite l'oxydation de ce substrat [7].

L'antioxydant peut agir par de nombreux mécanismes différents qui peuvent être l'élimination directe de l'oxygène, le piégeage des espèces oxygénées ou azotées réactives (ROS et NOS), l'inhibition de la formation de ces ROS et NOS, la chélation des ions métalliques nécessaires à la génération des ROS ou la stimulation des défenses antioxydantes endogènes [6].

Parmi les molécules antioxydantes spécialement les «petites» molécules antioxydantes telles les vitamines (α -tocophérol, acide ascorbique, etc...) mais également sur de nombreux composés naturels extraits de plantes, notamment les caroténoïdes, les composés phénoliques dont font partie les acides phénoliques et les flavonoïdes [7, 8].

I.2.1. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs [9- 10] (Figure I.6). Il s'agit de :

- La présence d'une fonction catéchol sur le cycle B : La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en *ortho* de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.

- La présence d'un motif enone dans le cycle C.

La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

- La présence de groupement hydroxyle en position 3.

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé. La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones [11].

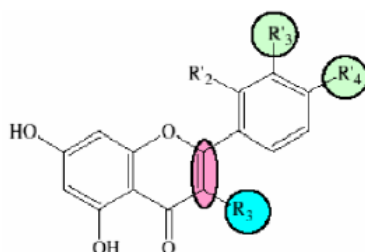


Figure I.6: Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes

I.3. Les flavonoides isolés du genre *Chrysanthemum*

I.3.1. Description botanique du genre *Chrysanthemum*

Le genre *Chrysanthemum* appartient à la famille des Astéracées qui constitue l'une des plus vastes familles du règne végétal avec de 900 genres et au moins 20 000 espèces [12]. Ce genre comprend près de 200 espèces de plantes arbustives originaires des zones tempérées et subtropicales de l'hémisphère [13]. Quezel et Santa (1963) [14] considèrent que 15 espèces appartenant à ce genre sont distribuées en Algérie :

C. clausonis (Pomel) Batt., *C. coronarium* L., *C. deserticum* (Murb.) Batt. et Trab., *C. fontanesii* (Boiss. et Reut.) Q. et S., *C. fuscatum* Desf., *C. grandiflorum* (L.) Batt., *C. gyanum*, *C. macrocarpum* Coss. et Kral., *C. macrotum* (D. R.) Ball., *C. maesii*, *C. multicaule*, *C. myconis* L., *C. segetum* L., *C. trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab., *C. viscido-hirtum*.

I.3.2. Activités biologiques des espèces *Chrysanthemum*

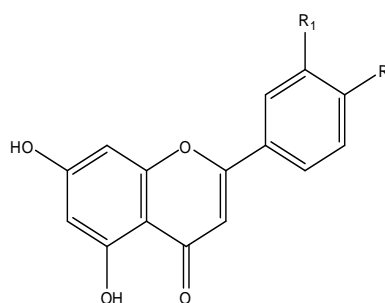
Les activités biologiques des espèces *Chrysanthemum* sont aussi variées que le sont leurs métabolites secondaires (sesquiterpènes lactones, flavonoïdes etc...). Citons par exemple l'activité antimicrobienne (*C. anethifolium*) [15], anti-tumorale (*C. boreale* M.) [16] antivirale (*C. cinerarefolium* vis.) [17], anti-inflammatoire (*C. indicum* L.) [18] et anti-oxydante (*C. balsamita tanacetoides*) [19] etc...

Les flavonoïdes isolés d'espèces *Chrysanthemum* sont dressés dans les tableaux (I.1- I.4).

Tableau I.1. : Flavones aglycones isolées du genre *Chrysanthemum*

Flavones	Structure	Espèce	Référence
Acacétine	1a	<i>C. boreale</i>	[20]
		<i>C. morifolium</i>	[21]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[22]
		<i>C. zawadskii</i>	[23]
Apigénine	1b	<i>C. boreale</i>	[20]
		<i>C. cinerariaefolium</i>	[24]
		<i>C. coronarium</i>	[25]
		<i>C. morifolium</i>	[26]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[27]
		<i>C. vulgare</i> (L.) Bernh.	[28]
Chryisine	1c	<i>C. morifolium</i>	[29- 31]
Chrysoériol	1d	<i>C. coronarium</i>	[32, 21]
Diosmétine	1e	<i>C. morifolium</i> Ram.	[27]
Lutéoline	1f	<i>C. boreale</i>	[20]
		<i>C. cinerariaefolium</i>	[24, 33]
		<i>C. coronarium</i>	[25, 28]
		<i>C. morifolium</i>	[21, 34]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[27]
		<i>C. segetum</i>	[25]
		<i>C. vulgare</i> (L.) Bernh.	[28]

Structure	R ₁	R ₂
1a	H	OMe
1b	H	OH
1c	H	H
1d	OMe	OH
1e	OH	OMe
1f	OH	OH

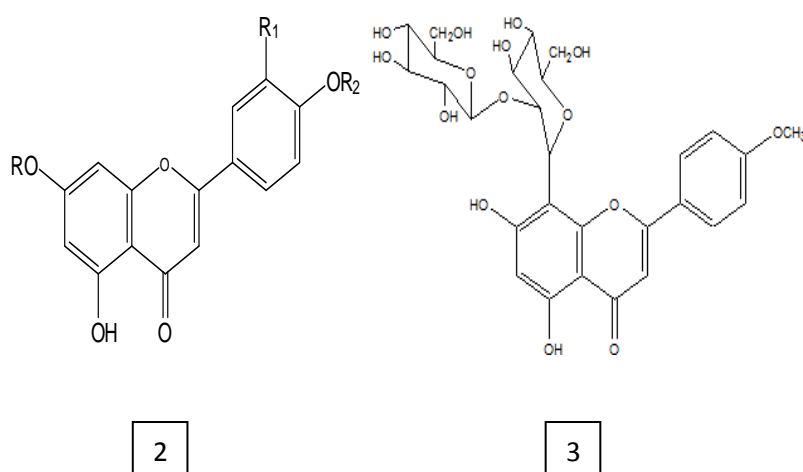


1

Tableau I.2. : Flavones glycosides isolées du genre *Chrysanthemum*

Flavones	Structure	Espèce	Référence
7- <i>O</i> -glucoside acacétine	2a	<i>C. morifolium</i>	[35, 36]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[37]
7- <i>O</i> -galactoside acacétine	2b	<i>C. indicum</i>	[38]
		<i>C. morifolium</i>	[29, 30]
7- <i>O</i> -rutinoside acacétine (Linarine)	2c	<i>C. arcticum</i>	[39]
		<i>C. boreale</i>	[20]
		<i>C. zawadskii</i>	[23]
7- <i>O</i> -glucoside apigénine	2d	<i>C. balsamita</i>	[40]
		<i>C. morifolium</i>	[35, 36, 41]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[27, 37]
		<i>C. vulgare</i> (L.) Bernh.	[28]
7- <i>O</i> -glucuronide apigénine	2e	<i>C. cinerariaefolium</i>	[24, 33]
		<i>C. coronarium</i>	[32]
		<i>C. leucanthemum</i>	[42]
		<i>C. morifolium</i>	[54]
7- <i>O</i> - β -D-(4'-caffeoyle) glucuronide apigénine	2f	<i>C. morifolium</i>	[54]
7- <i>O</i> -glucoside diosmétine	2g	<i>C. morifolium</i>	[35]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[27]
7- <i>O</i> - β -glucuronide diosmétine	2h	<i>C. morifolium</i> L.	[33]
7- <i>O</i> -glucuronide eriodictyol	2i	<i>C. morifolium</i>	[44]

7- <i>O</i> -glucoside lutéoline	2j	<i>C. balsamita</i>	[40]
		<i>C. coronarium</i>	[42]
		<i>C. coronarium</i> L.	[32]
		<i>C. boreale</i>	[45]
		<i>C. indicum</i> L.	[45]
		<i>C. lavendulaefolium</i>	
		<i>C. morifolium</i>	[34, 35, 41]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[27, 37]
		<i>C. segetum</i> L.	[32]
7- <i>O</i> - glucuronide lutéoline	2k	<i>C. coronarium</i> L.	[32]
		<i>C. morifolium</i> L.	[33]
7-rutinosides lutéoline	2l	<i>C. coronarium</i>	[32]
4'-méthylapigénine 8 (2''glucosyl) <i>C</i> -glucoside	3	<i>C. viscidhirtum</i>	[46]

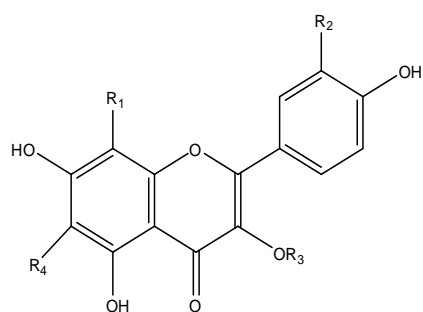


Structure	R	R ₁	R ₂
2a	Glc	H	Me
2b	Gal	H	Me
2c	Rha-Glc	H	Me
2d	Glc	H	H
2e	Glur	H	H
2f	4'-Caffeoyl- Glur	H	H
2g	Glc	OH	Me
2h	Glur	OH	Me
2i	Glur	OH	OH
2j	Glc	OH	H
2k	Glur	OH	H
2l	Rha-Glc	OH	H

Tableau I.3: Flavonols aglycones isolés du genre *Chrysanthemum*

Flavonols	Structure	Espèce	Référence
Gossypétine	4a	<i>C. segetum</i> L.	[47]
Isorhamnétine	4b	<i>C. leucanthemum</i>	[48]
		<i>C. nankingens</i>	[49]
Jacéidine	4c	<i>C. cinerariaefolium</i>	[24]
Kaempférol	4d	<i>C. leucanthemum</i>	[48]
		<i>C. nankingense</i>	[49]
		<i>C. segetum</i>	[25]
Patulétine	4e	<i>C. leucanthemum</i>	[47]
		<i>C. sensus stricto</i>	[42]
Quercétagétine	4f	<i>C. coronarium</i>	[50]
		<i>C. coronarium</i> L.	[47]
		<i>C. segetum</i> L.	[47]
		<i>C. sensus stricto</i>	[42]
6-méthoxy quercétagétine	4g	<i>C. coronarium</i> L.	[47]
3'-méthoxy quercétagétine	4h	<i>C. coronarium</i>	[32]
		<i>C. coronarium</i> L.	[47]
3,6-diméthoxy quercétagétine	4i	<i>C. cinerariaefolium</i>	[33]
6, 3'-diméthoxy quercétagétine	4j	<i>C. coronarium</i> L.	[47]
Quercétine	4k	<i>C. cinerariaefolium</i>	[33]

Quercétine	4k	<i>C. Leucanthemum</i>	[48]
		<i>C. morifolium</i>	[21]
		<i>C. morifolium</i> Ram.	[51]
		<i>C. nankingense</i>	[49]
3-méthoxy quercétine	4l	<i>C. coronarium</i>	[25]
3'-méthoxy quercétine	4m	<i>C. segetum</i>	[25]
Spinacétine	4n	<i>C. leucanthemum</i>	[48]

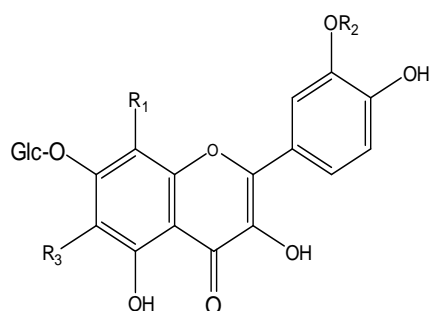


4

Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
4a	OH	OH	H	H
4b	H	OMe	H	H
4c	H	OMe	Me	OMe
4d	H	H	H	H
4e	H	OH	H	OMe
4f	H	OH	H	OH
4g	H	OH	H	OMe
4h	H	OMe	OH	OH
4i	H	OH	OMe	OMe
4j	H	OMe	H	OMe
4k	H	OH	H	H
4l	H	OH	Me	H
4m	H	OMe	H	H
4n	H	OMe	H	OMe

Tableau I.4. : Flavonols glycosides isolés du genre *Chrysanthemum*

Flavonols	Structure	Espèce	Référence
7-glucoside gossypétine	5a	<i>C. segetum</i>	[52]
7-glucoside patuléine	5b	<i>C. carinatum</i> Schousbeo.	[32]
		<i>C. nivellei</i> Maire.	
		<i>C. viscidohirtum</i> (Schott) Thellung.	
7-glucoside quercétagétine	5c	<i>C. coronarium</i> L.	[32]
		<i>C. nivellei</i> Maire.	
		<i>C. segetum</i> L.	
		<i>C. viscidohirtum</i> (Schott) Thellung	
7-glucoside-3'-méthoxy quercétagétine	5d	<i>C. coronarium</i>	[42, 53]
7-glucoside quercétine (quercimeritrine)	5e	<i>C. boreale</i>	[45]
		<i>C. carinatum</i> Schousbeo	[32]
		<i>C. coronarium</i>	[52]
		<i>C. coronarium</i> L.	[32]
		<i>C. indicum</i> L.	[45]
		<i>C. lavendulaefolium</i> .	[45]
		<i>C. nivellei</i> Maire	[32]
		<i>C. segetum</i>	[27, 50, 52]
		<i>C. segetum</i> L.	[32]
		<i>C. sensus stricto</i>	[42]
<i>C. viscidohirtum</i> (Schott) Thellung	[32]		



5

Structure	R ₁	R ₂	R ₃
5a	OH	H	H
5b	H	H	OMe
5c	H	H	OH
5d	H	Me	OH
5e	H	H	H

Références bibliographiques

- 1-Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. 1996. Free Radical Biol. Med. 20 (7): 933-956.
- 2-Harborne, J.B., Baxter, H. Eds. 1999. The handbook of natural flavonoids. Vol.1, John Wiley and Sons, Chichester.
- 3-Harborne, J.B., 1988. The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman and Hall.London.
- 4-Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Technique et Documentation. Paris.
- 5-Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W., 2000. J. Sci and Food. Agric. 80(7): 1081-1093.
- 6-Halliwel, B., 1997. Adv. Pharmacol., 38: 3-20.
- 7-Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O.I., 1995. Food. Chem. Toxicol., 33(7) : 601-617.
- 8- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, (3ème ed.), Editions médicales internationales, éditions Tec et Doc.
- 9- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D. j., Tromp, M. N. J. L., Griffioen D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., Bast, A. 1996. Free Radic. Biol. Med. 20, (3): 331-342.
- 10- Aliaga, C., Lissi A. E.2004. Can. J. Chem. 82: 1668-1673.
- 11- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. 2002. J. Nutri. Biochem. 13, (10): 572-584.
- 12- Aeschimann, D., Lauber, K., Moser, D. M., Theurillat, J. P., 2004. Flora alpina. Belin, Paris,
- 13- Ozenda, P., Hunbert, H., 1958. La flore du Sahara Septentrional et Cenral, 437-438.
- 14- Quezel, P., Santa, S., 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions Désertiques Méridionales, tome II, édition C.N.R.S. Paris, 982-988.
- 15- Mitscher, L., A., Leu, R. P., Bathala, M. S., Wu, W. N., Beal, J. L., White. R. Coll., 1972. Pharmacology. Lloydia, 35(2): 157-166.
- 16- Lee, J. R., Yang. M. S, Jang. D. S., Ha, T. J., Park, K. M., Lee, C. H., Kho, Y. H., Park, K. H., 2001. Planta Medica, 67(6): 585-587.
- 17- Stanberry, L. R., Bernstein, D. I., Myers, M. G., 1986. Antiviral Research. 6(2): 95-102.

- 18- Mou, L. Y., Zhu, L. Y., Lin, Z. Y., Liang, X. T., 2001.** J. of Asian Nat. Prod. Res., 3(2): 103-116.
- 19- Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Gruzdiene, D., 2000.** Food Research International, 33(9): 785-791.
- 20- Shin, K. H., Kang, S.S., Seo, E. A., Shin, S.W., 1995.** Arch. of Pharm. Res., 18 (2): 65-8.
- 21- Miyazawa, M., Hisama, M. 2003.** Biosci., Biotech., and Biochem., 67(10): 2091-2099.
- 22- Harborne, J. B., 1967.** Comparative Biochemistry of the flavonoids. Academic Press. New York p 40.
- 23- Singh, R. P., Agrawal, P., Yim, D., Agarwal, C., Agarwal, R., 2005.** Carcinogenesis, 26(4): 845-854.
- 24- Sashida, Y., Nakata, H., 1983.** Phytochemistry, 22(5): 1219-1222.
- 25- Valant, V.K. M., Wollenweber, E., Faure, R., Gaydou, E., 2003.** Biochemical Systematics and Ecology, 31: 545-548
- 26- Miyazawa, M., Hisama, M., 2003.** Biosci., Biotech., Biochem., 67(10): 2091-2099.
- 27- Lingyun, J., Qishi, S., Shunwang, H., 2003.** Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi, 13(3): 159-161.
- 28- Khalifa, A., Abdallah, O., M., Mesbah, M.K., 1991.** Bulletin of the Faculty of Pharmacy 29(3): 63-66.
- 29- Wang, H. K, Xia, Y. Yang, Z. Y., Natschke, S. L. M., Lee, K. H., 1998.** Adv. Exp. Med. Biol. 439: 191-225
- 30- Hu, C. Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C., Lee, K. H., 1994.** J. Nat. Prod., 57(1): 42-51.
- 31- Lee, K. H., 1996.** Book of Abstracts, American Chemical Society.
- 32- Harborne, J. B., Heywoode, V. H., Saleh, N. A. M., 1970.** Phytochemical Unit. Phytochemistry, 9 (9) : Pages 2011-2017.
- 33- Glennie, C. W, Harborne. J. B. 1972.** Pyrethrum Post 1972, 11(3): 82-4.
- 34- Hu, B., Jiang, H., Yang., J., Zeng, S., 2004.** Zhejiang Daxue Xuebao, Yixueban, 33(1): 29-32.
- 35- Asen, S., Stewart., R. N., Norris, K. H., 1975.** Phytochemistry, 14 (5-6): 1443-1444.
- 36- Liu, J., Wu, D., Wang, L., Liu, J., Wang, J., 2001.** Zhongcaoyao, 32(4): 308-310.
- 37- Liu, J., Shen, Q., Liu, J., Wu, D., Wang, J., 2001.** Zhongguo Zhongyao Zazhi, 26(8): 547-548.
- 38- Chatterjee, A., Sarkar, S., Saha, S. K., 1981.** Phytochemistry, 20(7): 1760-21.
- 39- Plouvier, V., 1966.** Sciences Naturelles, 262(12) : 1368-1371.

- 40- Wolbis, M., 1981.** *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 38(6) : 705-710.
- 41- Arisawa, M., Ishiwari, Y., Nakaoki, T., Sekino, S., Takakuwa, T., 1969.** *Shoyakugaku Zasshi*, 23(2): 49-52.
- 42- Harborne, J. B, Heywood, V. H., Saleh, N. A. M., 1970.** *Phytochemistry*, 9 (9): 2011-2017.
- 43- Beninger, C. W., Hall, J. C., 2005.** *Biochem. Syst. and Ecol.* 33 (2): 103-111.
- 44- Beninger, C. W, Abou-Zaid, M. M., Kistner, A. L., Hallett, R. H., Iqbal, M. J., Grodzinski, B, Hall, J .C., 2004.** *J. Chem. Ecol.*, 30(3): 589-606.
- 45- He, Y., Li, R., Shen, L., 1982.** *Beijing Yixueyuan Xuebao*, 14(3): 259-261.
- 46- Khallouki, F., Hmamouchi, M., Younos, C., Soulimani, R., Bessiere, J. M., Essassi, E. M. 2000.** *Phytoterapia*, 71(5): 544-546.
- 47- Harborne, J. B., Heywood, V. H., King, L., 1976.** *Biochem. Syst. Ecol.*, 4: 1- 4.
- 48- Wilcox, B. H. R., 1984.** *Biochem. System.Ecol.* 12(4): 357-361.
- 49- Weng, D., Wang, H., Weng, J., 2001.** *Taowu Shengwu Jishu*, 8(3): 167-169.
- 50- Anyos, T., Steelink, C., 1960.** *Archives of Biochem. Biophys.*, 90, 63.
- 51- Jia, L., Sun, Q., Huang, S., 2003.** *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi*, 13(3): 159-161.
- 52- Giwman, T. A., Strrlink, C., 1957.** *J. Organic Chemistry*, 22: 946.
- 53- Jurd, L., 1962.** *Chemistry of Flavonoid Compounds.* Pergamon Press, Oxford, p 126.
- 54- Nam, S. H., Choi, S. D., Jang, D. S., Choi, S. U., Yang, M. S., 1997.** *Han'guk Sikip'um Yongyang kwahak Hoechi.* 26 (1) : 144- 147.

II.1. Description des travaux et discussion des résultats sur l'espèce *Chrysanthemum trifurcatum*

II.1.1. Description botanique

Chrysanthemum trifurcatum (Desf.) Batt. et Trab. est une plante vivace à souche ligneuse, peu élevée (15-30 cm) et rameuse dès la base. Les feuilles sont pennatiséquées, à lanières courtes, lancéolées aiguës et mucronulées. Les capitules sont hétérogames, radiés, sur de longs pédoncules, atteignant 2 cm de diamètre sans les ligules. Les bractées sont orbiculaires, atténuées à la base et entièrement scarieuses vers l'extrémité. Les ligules sont jaunes. Les akènes sont tous semblables, à couronne membraneuse denticulée et plus ou moins auriculée. La plante pousse sur les sables et les terrains pierreux [1], figure II.1.

II.1.2. Classification dans la systématique botanique [1, 2]

Royaume	Plantes
Sous royaume	Tracheobiontes
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermatophytes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Chrysanthemea
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Chrysanthemum</i>
Espèce	<i>Chrysanthemum trifurcatum</i> (Desf.) Batt. et Trab.



Figure II.1 : Photographie de *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab

II.1.3. Utilisation traditionnelle

La plante *C. trifurcatum* est connue sous le nom « *gartoufa* ». Elle est utilisée dans la médecine populaire tunisienne pour traiter la constipation. Elle est aussi réputée pour soulager

des douleurs spécifiquement féminines. Les fleurs séchées peuvent être additionnées à la soupe, elles peuvent être encore moulues, mélangées avec de la farine et préparées en purée [3]. Au Maroc, l'infusion de la plante entière est utilisée contre les désordres hépatiques [4].

II.1.4. Matériel végétal

La plante *Chrysanthemum trifurcatum* a été récoltée par Mr. Kamel Kabouche dans une station à quelques kilomètres de Ghardaïa. Elle a été identifiée par le Professeur Gérard De Belair (Université d'Annaba).

II.1.5. Extraction

Les parties aériennes (1 kg) de la plante *Chrysanthemum trifurcatum* séchées puis réduites en poudre sont mises à macérer dans le mélange Méthanol + Eau (70/ 30) pendant (3 x 24h). Après filtration, le filtrat obtenu est concentré à sec sous pression réduite dans un Rotavapor; annexe (figure III. 3). L'extrait ainsi obtenu, est soumis à l'extraction liquide-liquide par le dichlorométhane (CH_2Cl_2), l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le *n*-butanol (*n*-but), avec des quantités de 3 x 300 ml pour chaque solvant. Les 3 extraits sont évaporés à sec, puis pesés.

Tableau II.1: Rendements des extractions

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
	Extrait CH_2Cl_2	1,18	0,12
	Extrait AcOEt	5,82	0,58
	Extrait <i>n</i> -but	16,34	1,63

La figure ci-dessous présente les différentes étapes de l'extraction des parties aériennes du *Chrysanthemum trifurcatum*.

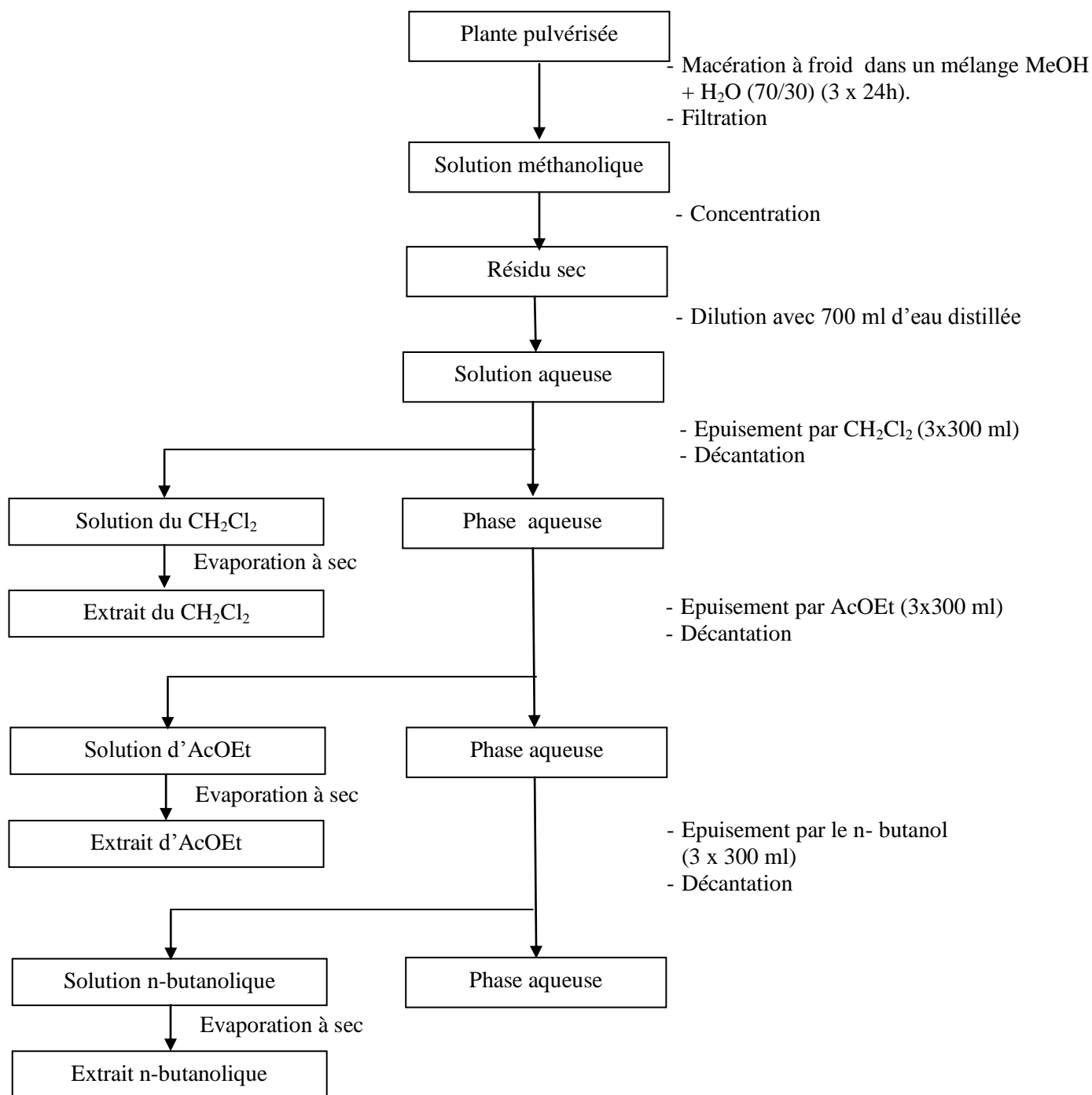


Figure II.2 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes du *Chrysanthemum trifurcatum*.

Chaque extrait subit une chromatographie sur couche mince afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer et donc pouvoir choisir l'extrait à étudier. Notre choix s'est porté sur celui de la phase acétate d'éthyle.

II.1.6. Séparation des métabolites secondaires de la phase acétate d'éthyle

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice, la meilleure séparation obtenue était avec l'éluant Dichlorométhane / Méthanol (8/2).

Une masse de 4,5 g de l'extrait d'acétate d'éthyle est mélangée à une quantité de gel de silice puis chromatographiée sur une colonne de gel de silice 60 (0,063-0,2 mm). L'élution a été initialement effectuée par le dichlorométhane pur puis on augmente progressivement la polarité de la phase mobile par addition de méthanol.

Des fractions de 20 millilitres sont recueillies en bas de colonne dans des tubes, ainsi 174 fractions sont obtenues. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) de gel de silice. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées à l'aide d'un réactif de détection obtenu à partir d'un mélange d'acide acétique, acide sulfurique et de l'eau (80 /16/4) et finalement chauffées avec un sèche-cheveux jusqu'à l'apparition de taches de diverses couleurs. La progression des produits dans la colonne est rassemblée dans le tableau II.2.

Tableau II.2: Résultat du fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle du *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab.

Fraction	Eluant		Quantité d'éluant (ml)
	CH ₂ Cl ₂ %	MeOH%	
F ₁	100	0	300
F ₂	95	5	300
F ₃₋₄₃	92	8	800
F ₄₄₋₅₂	88	12	200
F ₅₃₋₅₈	85	15	100
F ₅₉₋₆₃	82	18	100
F ₆₄₋₆₉	75	25	100
F ₇₀₋₁₁₇	70	30	600
F ₁₁₈₋₁₂₂	50	50	100
F ₁₂₃₋₁₇₄	0	100	1000

Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince, tableau II.3.

Tableau II.3. : Regroupement des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle du *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. et Trab.

Fraction	Eluant	Observation	
F ₁₋₄	Cyclohexane / AcOEt (9/1)	Mélange complexe	
F ₅₋₈	Cyclohexane / AcOEt (6/4)	Mélange complexe	
F ₉₋₁₄		Mélange séparable non traité du à sa faible quantité	
F ₁₅	Cyclohexane / AcOEt (5/5)	Mélange séparable non traité du à sa faible quantité	
F ₁₆		Mélange séparable	
F ₁₇		Mélange séparable non traité due sa faible quantité	
F ₁₈		Mélange complexe	
F ₁₉₋₂₁		Mélange séparable	
F ₂₂		Mélange complexe	
F ₂₃		Mélange séparable	
F ₂₄		Mélange complexe	
F ₂₅₋₂₇		Ether diéthylique / CH ₂ Cl ₂ (6/4)	Mélange séparable
F ₂₈₋₃₆			Mélange complexe
F ₃₇	Mélange séparable		
F ₃₈₋₄₈	Ether diéthylique / CH ₂ Cl ₂ (8/2)	Mélange complexe	
F ₄₉		Mélange complexe	
F ₅₀		Mélange séparable	
F ₅₁₋₅₉		Mélange complexe	
F ₆₀₋₇₀		Mélange complexe	
F ₇₁₋₇₅		CH ₂ Cl ₂ / MeOH (8/2)	Mélange complexe
F ₇₆₋₈₈	Cyclohexane / Acide acétique / Ether diéthylique (10/1/10)	Mélange complexe	
F ₈₉₋₁₀₁	Cyclohexane / Acide acétique / Ether diéthylique (10/1/17)	Mélange complexe	
F ₁₀₂₋₁₂₈	Cyclohexane / Acide formique / Ether diéthylique (6/0,5/5,5)	Mélange complexe	
F ₁₂₉₋₁₄₁	Toluène/ AcOEt/ Acide formique (6/4/1)	Mélange complexe	
F ₁₄₂₋₁₇₄	AcOEt/ MeOH/ Acide acétique (8/1/0,3)	Mélange complexe	

II.1.6.1. Purification des sous-fractions

La purification de ces sous-fractions a été effectuée par recristallisation. Les produits obtenus sont solubles dans le méthanol mais insolubles dans l'acétate d'éthyle. Ils ont été dissous dans un minimum de méthanol et saturés à l'acétate d'éthyle. Par séchage lent dans le mélange MeOH/ AcOEt, il se forme un précipité blanc (F₁₆) et des cristaux jaunes pour les fractions restantes.

a. Elucidation de la structure du composé F₁₆

- **Résultats des données chromatographiques**

Fluorescence : **Violette**

Révéléateur (Réactif de NEU) : **Jaune fluorescent.**

R_f: 0,228 (Cyclohexane / AcOEt/ CH₂Cl₂: 3 / 4 / 3)

0,447 (Cyclohexane / AcOEt : 6 / 6 ; 2^{ème} élution)

- **Résultats des données spectrales**

Tableau II.4: Données des spectres UV-Visible du produit F₁₆

Réactifs	λ_{\max} (nm)		
	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	334	-	269
NaOH	391	310	275
AlCl ₃	382	302, 346	276
AlCl ₃ .HCl	382	300, 340	278
NaOAc	384	307	275
NaOAc+H ₃ BO ₃	347	297	271

Tableau II.5 : Données du spectre RMN ¹H dans CD₃OD à 250 MHz du produit F₁₆

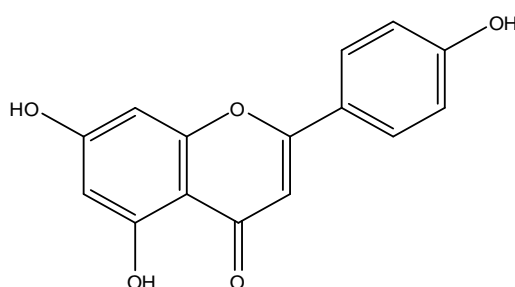
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
6,23	1H	d	2,1	H ₆
6,48	1H	d	2,1	H ₈
6,62	1H	s	-	H ₃
6,96	2H	d	8,9	H _{3'} -H _{5'}
7,88	2H	d	8,9	H _{2'} -H _{6'}

- **Interprétation des résultats**

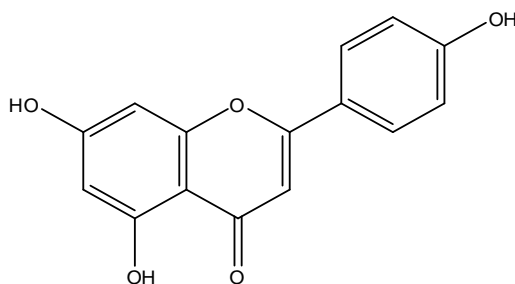
Le produit F₁₆ a donné une fluorescence jaune sous lampe de Wood, après révélation par le réactif de NEU, indiquant la présence d'un flavonoïde et l'observation d'une tache violette

sous lampe de Wood désigne un squelette d'une flavone. Le spectre UV effectué dans le méthanol permet de distinguer deux bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\max} = 269$ nm et l'autre à $\lambda_{\max} = 334$ nm confirmant la présence d'une flavone. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ($\Delta\lambda = 57$ nm) indiquant la présence d'un OH en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda_{\max} = 310$ nm montre la présence d'un OH libre en 7. L'absence d'effet hypsochrome après addition de HCl au système MeOH + AlCl₃ suggère l'absence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. L'effet bathochrome ($\Delta\lambda = 48$ nm) observé après addition de AlCl₃ + HCl à la solution neutre indique la présence d'un OH libre en 5 [1, 2], (Spectre a.1).

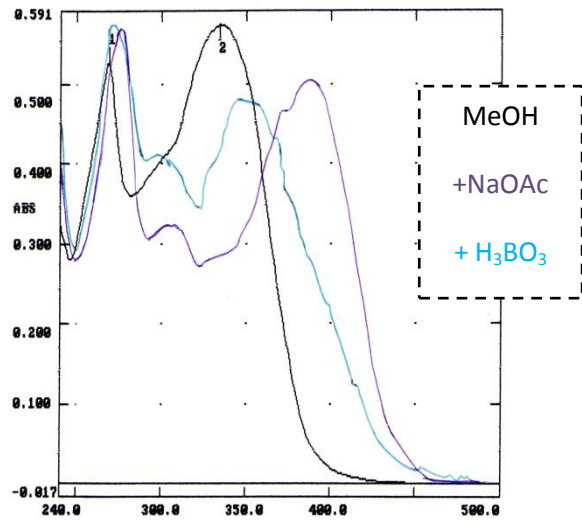
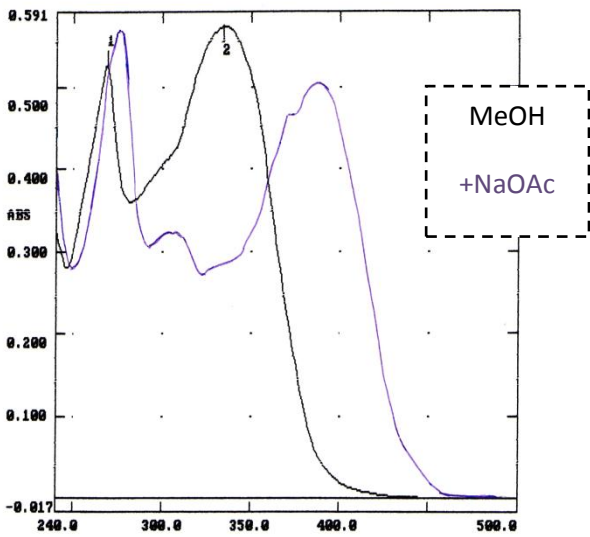
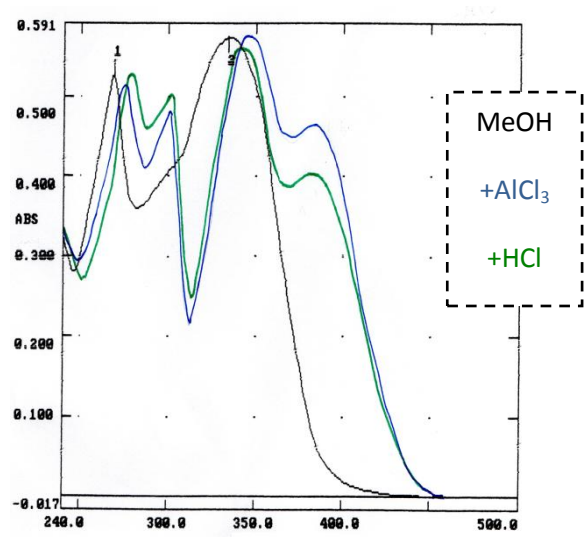
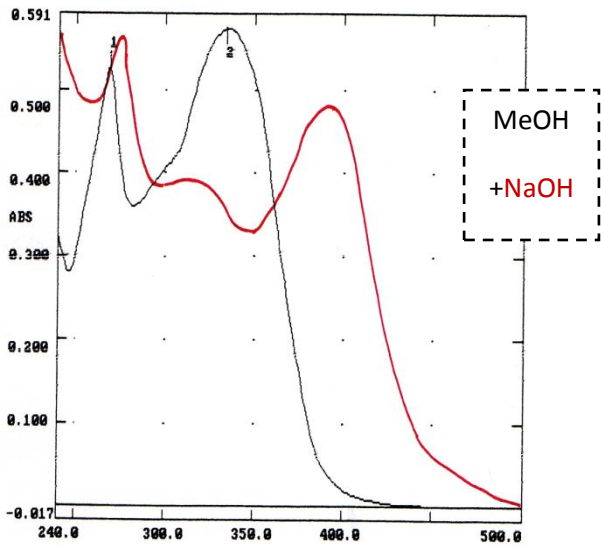
Ces données permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit F₁₆.



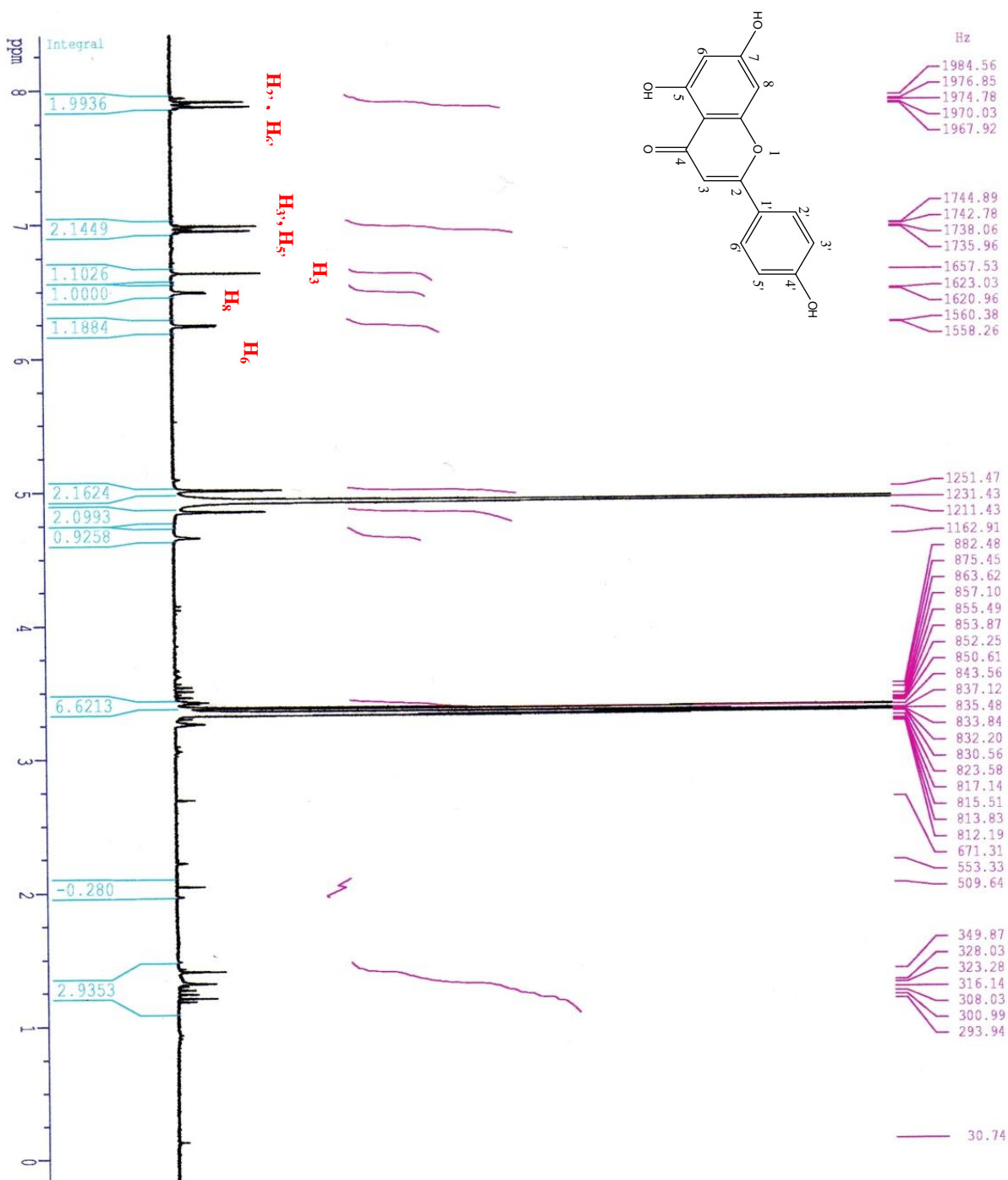
Le spectre RMN du proton, enregistré dans CD₃OD à 250 MHz, permet d'observer des signaux caractéristiques des protons aromatiques dont les déplacements chimiques sont compris entre 6 et 8 ppm. En effet, il montre la présence de deux doublets, respectivement à 6,23 ppm ($J = 2,1$ Hz) et 6,48 ppm ($J = 2,1$ Hz), caractéristiques de deux protons en couplage *mé*ta (H₆ et H₈), un singulet à 6,62 ppm, attribué à H₃ et deux doublets pour 4 protons, respectivement à 6,96 ($J = 8,9$ Hz) et 7,88 ppm ($J = 8,9$ Hz), caractéristiques des protons en couplage *ortho* (H₃, H₅) et (H₂, H₆), (Spectre a.2 et a.3), ce qui confirme que le produit F₁₆ est l'apigénine.



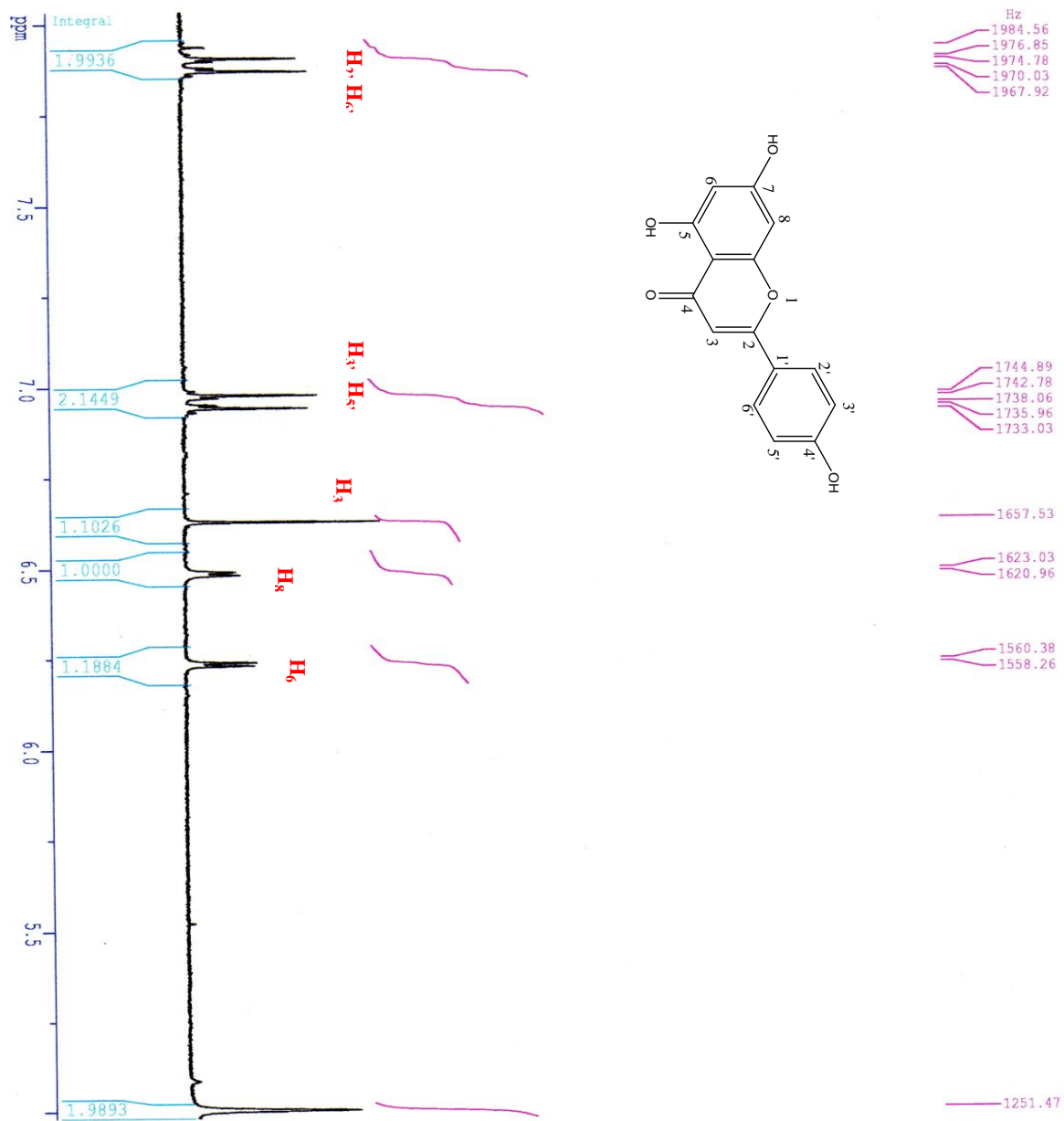
Apigénine



Spectre a.1 : Spectres UV du produit F₁₆



Spectre a.2 : Spectre RMN¹H du produit F₁₆



Spectre a.3 : Spectre RMN¹H étalé du produit F₁₆

b. Elucidation de la structure du composé F₂₅₋₂₇

● Résultats des données chromatographiques

Fluorescence : Jaune.

Révélateur (Réactif de NEU) : Jaune.

R_f : 0,353 (Toluène / AcOEt/ Acide formique : 9 /6,5 /0,5)

● Résultats des données spectrales

Tableau II.6: Données des spectres UV-Visible du produit F₂₅₋₂₇

Réactifs	λ_{\max} (nm)		
	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	367	-	255
NaOH	410	323	279
AlCl ₃	444	-	271
AlCl ₃ +HCl	421	358	266
NaOAc	395	321	276
NaOAc+H ₃ BO ₃	386	-	261

Tableau II.7: Données du spectre RMN ¹H dans CD₃OD à 250 MHz du produit F₂₅₋₂₇

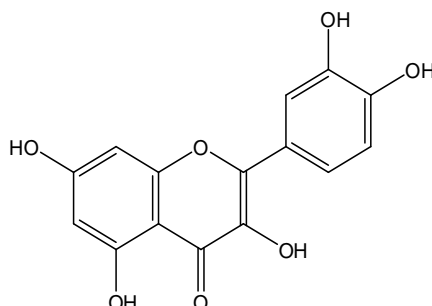
Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
6,20	1H	d	2	H ₆
6,40	1H	d	2	H ₈
6,90	1H	d	8,5	H _{5'}
7,66	1H	dd	8,5 et 2	H _{6'}
7,76	1H	d	2	H _{2'}

● Interprétation des résultats

La fluorescence jaune sous lampe de Wood indique un squelette flavonol confirmé par le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\max} = 255$ nm et l'autre à $\lambda_{\max} = 367$ nm. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ($\Delta\lambda = 43$ nm) avec diminution d'intensité indiquant la présence d'un OH en 3 sur le cycle C et un OH en 4' sur le cycle B. La présence d'une nouvelle bande à 323 nm montre la présence d'un OH libre en 7, ce qui est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = 21$ nm). L'effet hypsochrome ($\Delta\lambda = -23$ nm) observé après addition de HCl au système MeOH + AlCl₃ suggère la présence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome ($\Delta\lambda = 19$ nm) du spectre obtenu après

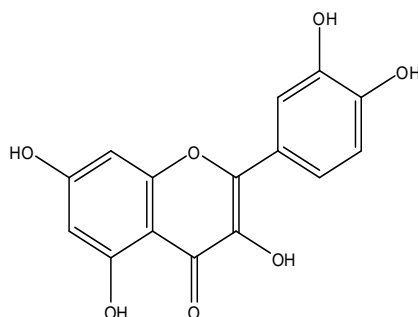
addition de H_3BO_3 au système $\text{MeOH} + \text{AcONa}$. L'effet bathochrome ($\Delta\lambda = 54 \text{ nm}$) observé après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ à la solution neutre indique la présence d'un OH libre en 5 (Spectre b.1).

Ces premiers résultats permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit F_{25-27}

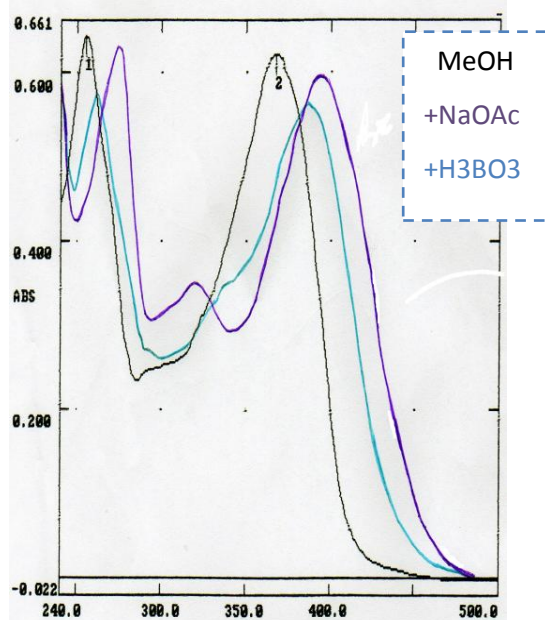
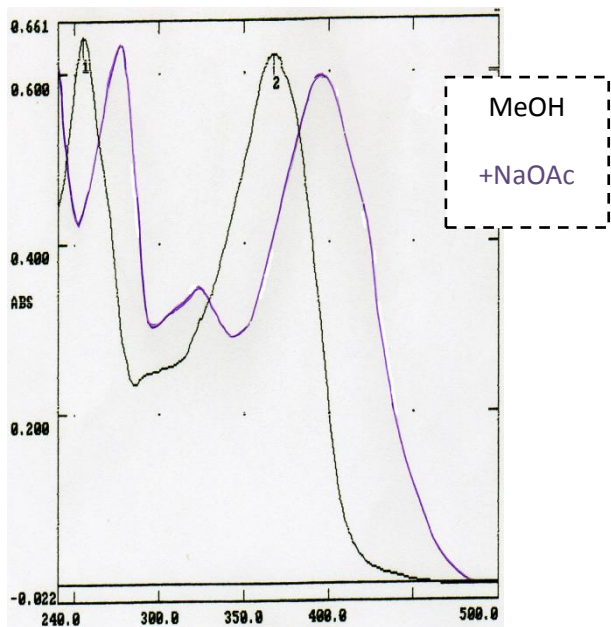
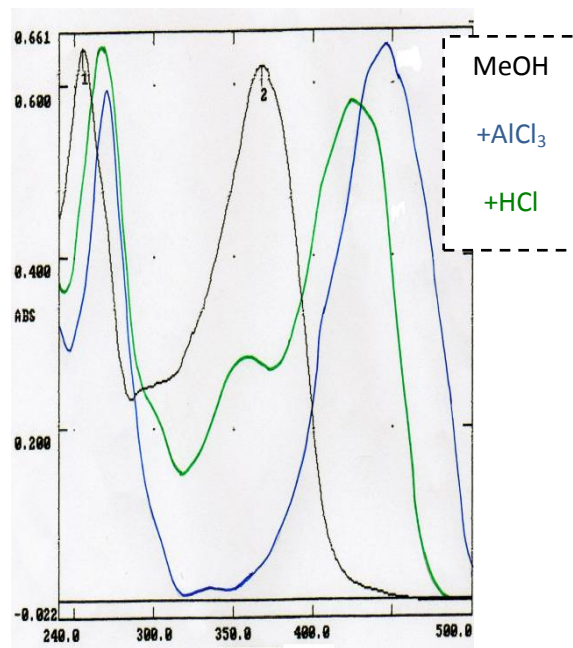
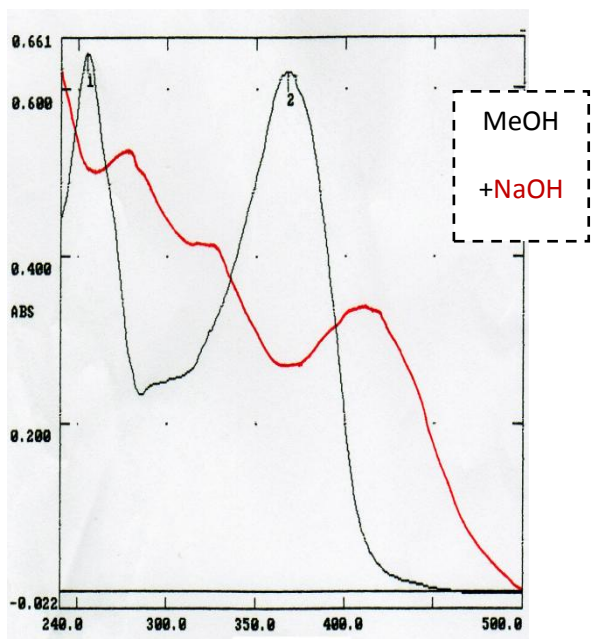


Le spectre RMN du proton enregistré dans CD_3OD à 250 MHz montre la présence de 3 doublets pour 3 protons, respectivement à 6,20, 6,40 et 7,76 ppm ($J = 2,0 \text{ Hz}$), caractéristiques des protons en couplage *mé*ta (H_6 , H_8 et H_2), un doublet à 6,90 ppm ($J = 8,5 \text{ Hz}$), attribué à H_5 et un doublet de doublet à 7,66 ppm ($J = 8,5$ et $2,0 \text{ Hz}$), caractéristique du proton H_6 (spectres b.2 et b.3). Ces attributions confirment la structure proposée.

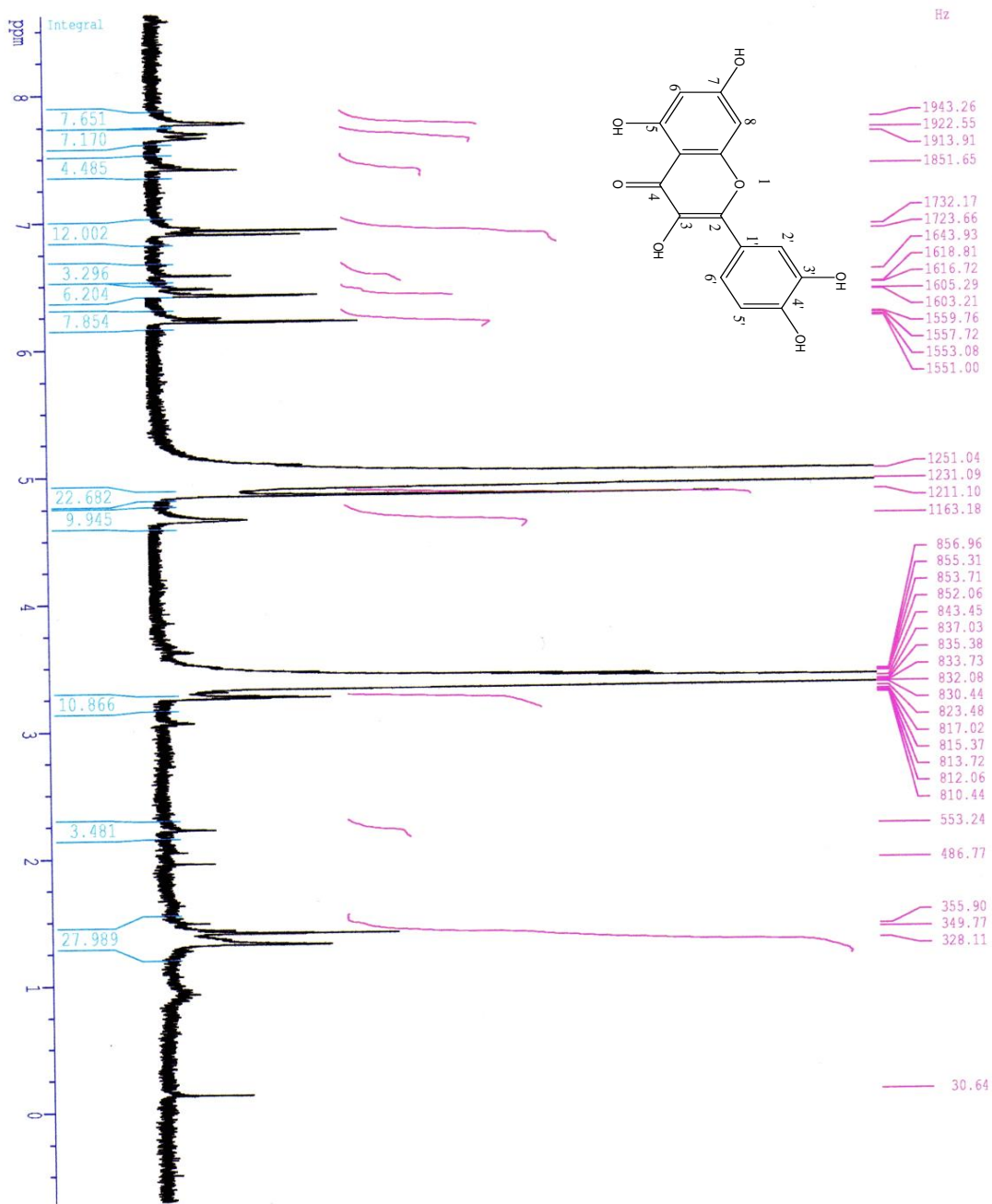
Les données spectroscopiques (UV, RMN ^1H) permettent d'identifier la structure de la quercétine.



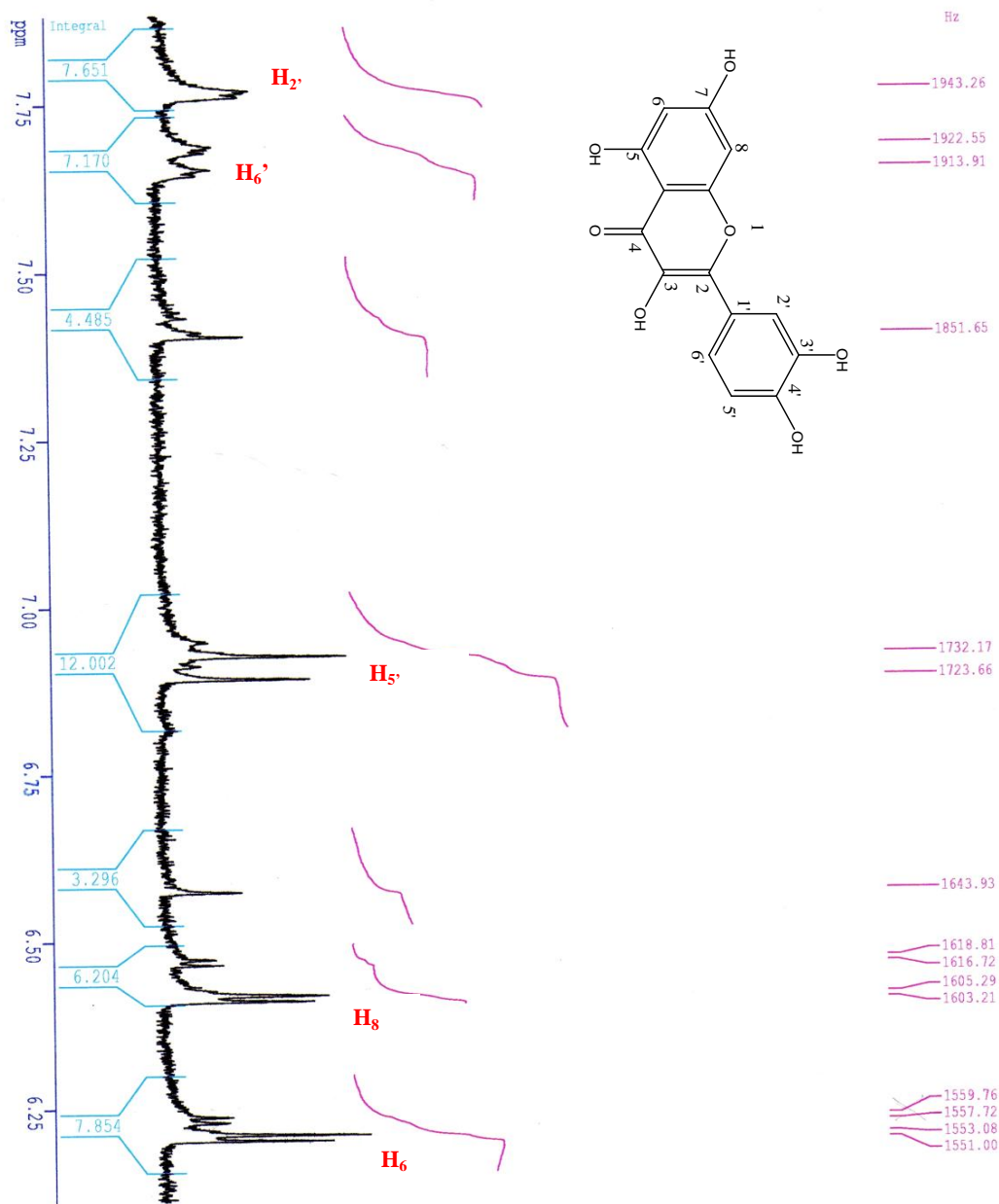
Quercétine.



Spectre b.1: Spectres UV du produit F₂₅₋₂₇



Spectre b.2: Spectre RMN¹H du produit F₂₅₋₂₇



Spectre b.3: Spectre RMN ^1H étalé du produit F₂₅₋₂₇

c. Elucidation de la structure du composé F₃₇

• Résultats des données chromatographiques

Fluorescence : Bleue

Révélateur (Réactif de NEU) : Jaune

R_f: 0,228 (Toluène / AcOEt/ Acide formique : 9 /6,5 /0,5)

R_f : 0,447 (Cyclohexane / AcOEt : 6 /7 ; 2^{ème} élution).

• Résultats des données spectrales

Tableau II.8. : Données des spectres UV-Visible du produit F₃₇

Réactifs	λ_{\max} (nm)	
	Bande I	Bande II
MeOH	316	290
NaOH	344	301
AlCl ₃	361	263
AlCl ₃ +HCl	329	244
NaOAc	315	289
NaOAc+H ₃ BO ₃	329	294

Tableau II.9. : Données du spectre RMN ¹H dans CD₃OD à 250 MHz du produit F₃₇

Déplacement chimique δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
6,24	1H	d	15,9	H ₂
6,30	1H	d	8,1	H ₈
6,94	1H	dd	8,1 et 1,9	H ₉
7,05	1H	d	1,9	H ₅
7,52	1H	d	15,9	H ₃

• Interprétation des résultats

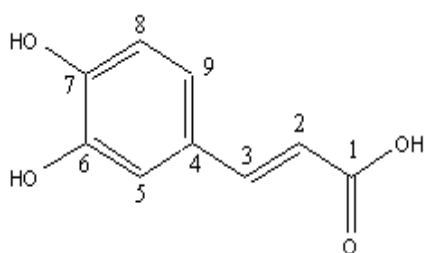
Le produit F₃₇ a donné une fluorescence bleue sous lampe de Wood. Les spectres UV obtenus montrent deux bandes d'absorption avec un épaulement remarquable sur la bande I (Spectre c.1). Ces spectres sont caractéristiques des acides phénoliques. Un déplacement bathochrome de la bande I de ($\Delta\lambda = 45$ nm) après addition d'AlCl₃ à la solution méthanolique indique la présence d'un noyau benzénique di-ortho-hydroxylé (Spectre c.1).

Le spectre RMN ¹H montre la présence d'un doublet à 6,24 ppm ($J = 15,9$ Hz) attribué à H₂, et un autre ayant la même constante de couplage apparaissant à 7,52 ppm attribué à H₃. La valeur de la constante de couplage indique que les 2 protons éthyléniques sont en position *trans*.

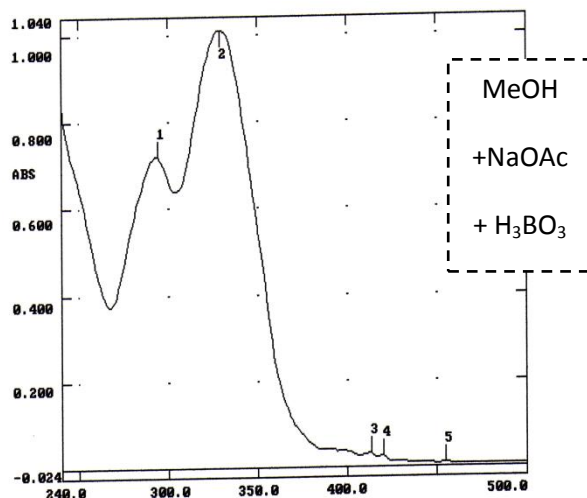
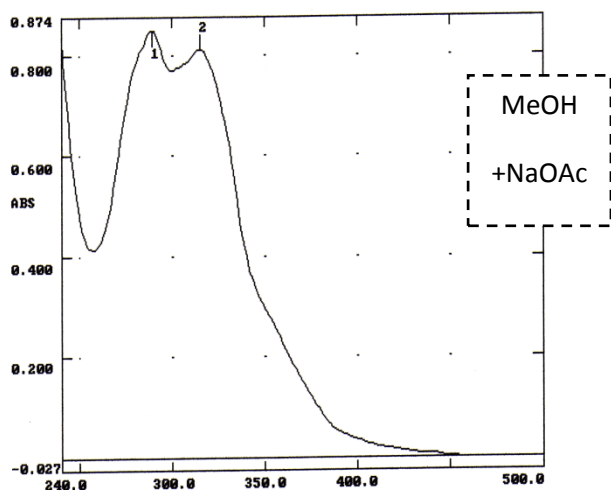
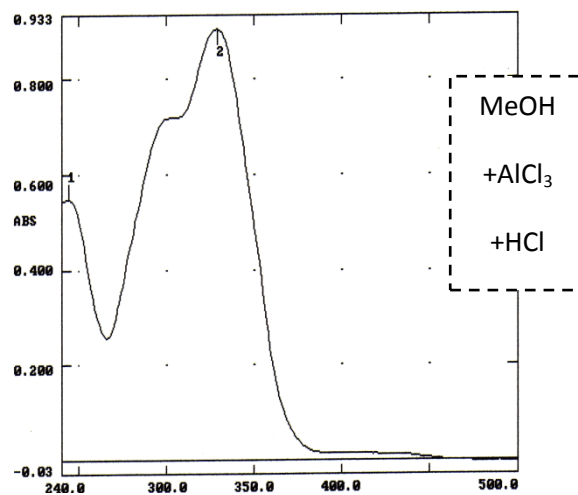
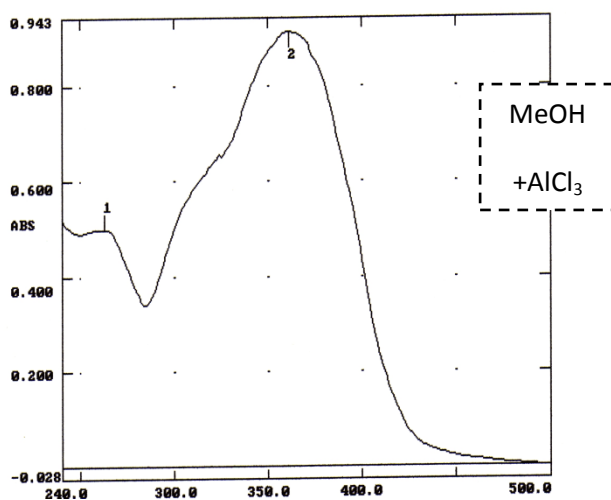
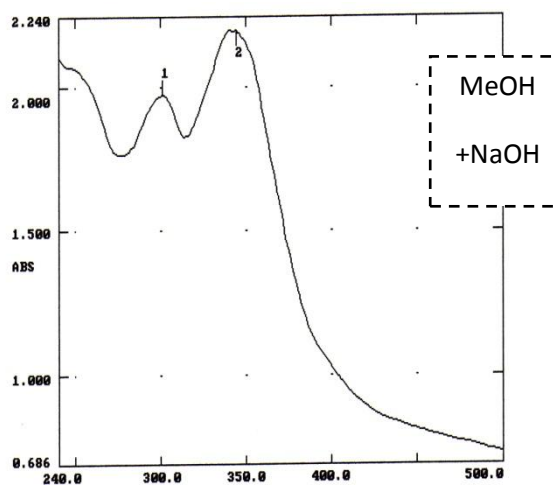
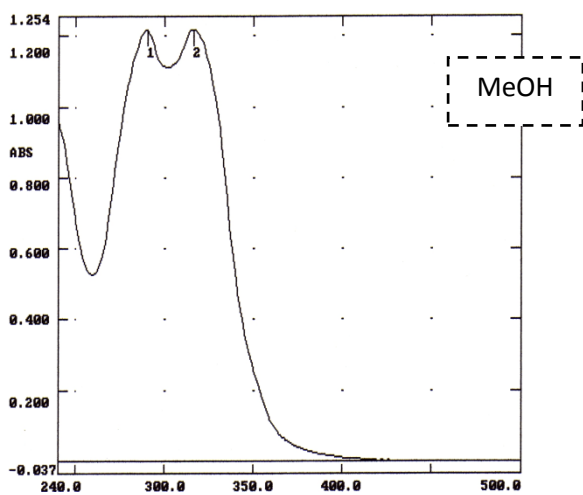
Le spectre permet d'observer également :

- Un doublet à 6,30 ppm qui ne peut être attribué qu'au proton H₈ car la valeur de la constante de couplage ($J = 8,1$ Hz) indique la présence d'un proton en *ortho*,
- Un doublet de doublet à 6,94 ppm ($J = 8,1$ et 1,9 Hz) qu'on attribue au proton H₉,
- Un doublet à 7,05 ppm donnant un couplage *mé*ta avec ($J = 1,9$ Hz) qu'on attribue au proton H₅ (Spectre c.2 et c.3).

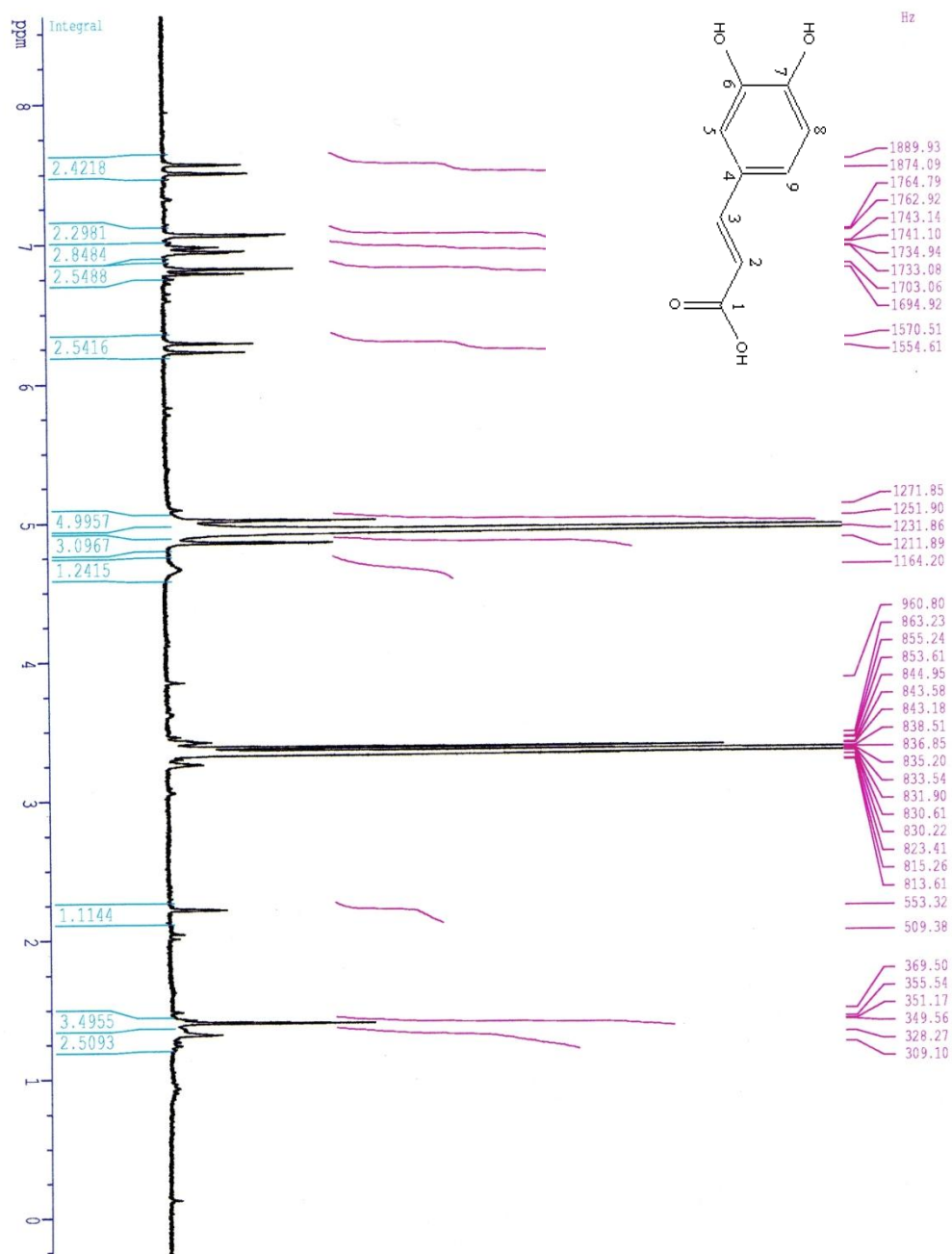
Ces résultats permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit **F**₃₇.



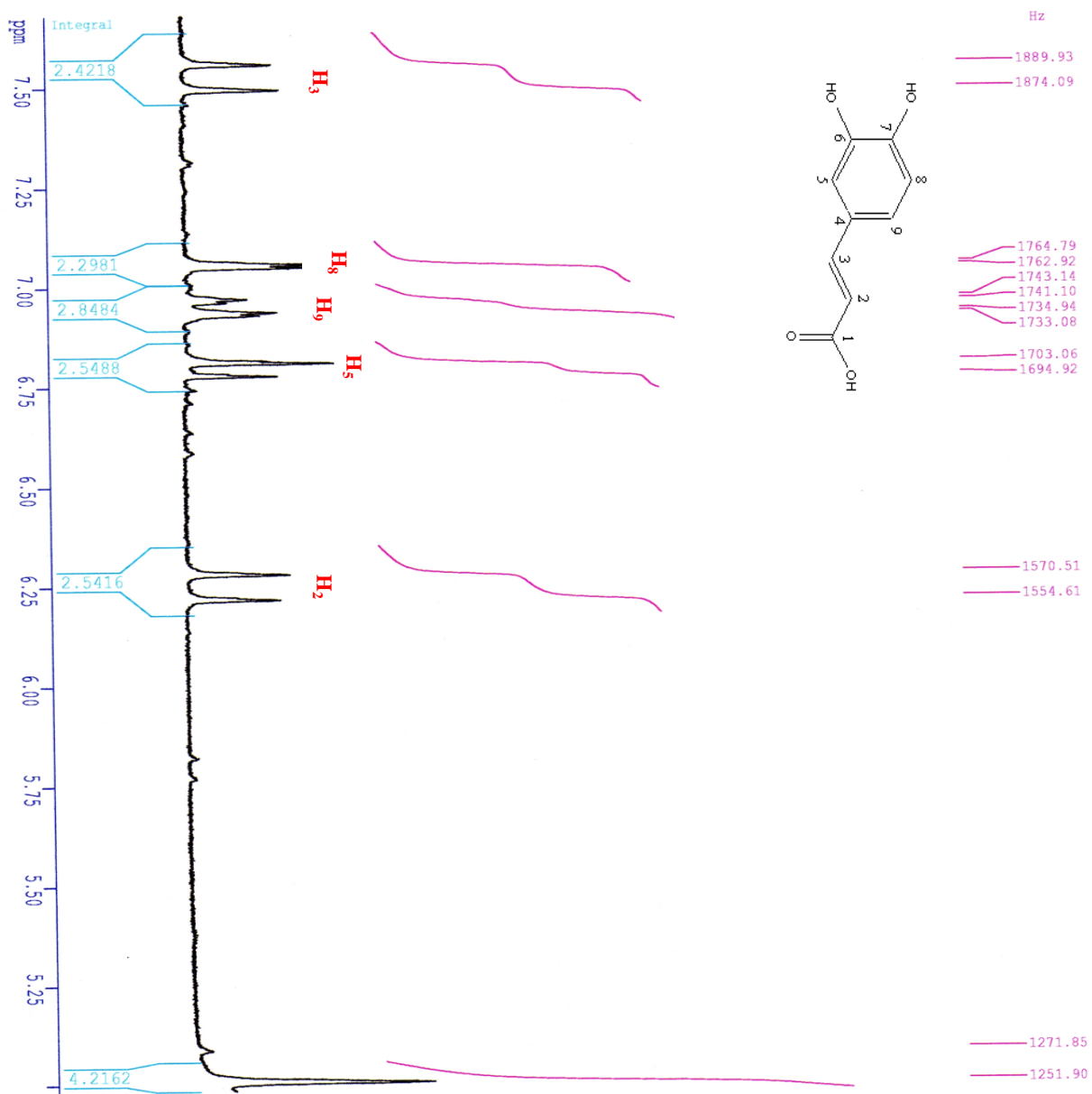
Acide caféique



Spectre c.1: Spectres UV du produit F₃₇



Spectre c.2 : Spectre RMN¹H du produit F₃₇



Spectre c.3 :RMN¹H étalé du produit F₃₇

d. Elucidation de la structure du composé F₁₉₋₂₁

• Propriétés physico-chimiques

Le composé F₁₉₋₂₁ se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en présentant une fluorescence violette sous lampe UV à 365 nm, laissant envisager une structure de type flavonoïdes.

Tableau II.10 : Données spectroscopiques UV-visible du produit F₁₉₋₂₁.

Réactif de déplacement	λ_{\max} (nm)				
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Déplacement	Interprétation
MeOH	334	-	269	-	Flavone ou flavonol substitué en 3.
NaOH (base forte)	389	-	270	+ 55	OH libre en 4' OH substitué en 7
AlCl ₃	390	-	274	+ 56	OH libre en 5
AlCl ₃ + HCl	392	-	274	-	Absence de 3',4'-di-OH sur le cycle B
AcONa (base faible)	387	-	268	-	
AcONa / H ₃ BO ₃	338	-	269	-	Absence de 3',4'-di-OH sur le cycle B

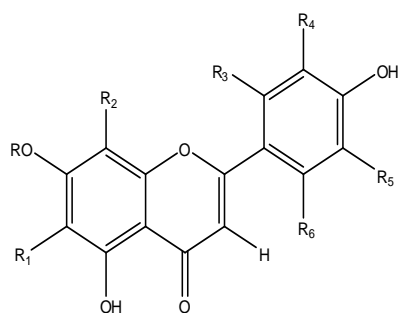
• Interprétation des résultats

La fluorescence violette sous lampe de Wood indique un squelette flavone confirmé par le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\max} = 269$ nm et l'autre à $\lambda_{\max} = 334$ nm.

L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ($\Delta\lambda = + 55$ nm) indiquant la présence d'un groupement OH libre en 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm indique la présence d'un OH substitué en 7.

L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = 56$ nm) observé après addition d'AlCl₃ à la solution méthanolique indique la présence d'un groupement OH libre en 5.

L'absence d'un effet hypsochrome après addition de HCl au système (MeOH + AlCl₃) suggère l'absence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande II, après addition de H₃BO₃ au système (MeOH + AcONa).



Le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO- d_6 à 300 MHz confirme le squelette flavonique monosubstitué en 4' et montre la présence d'un groupement glycosyle dont le proton anomérique est observé sous forme de doublet à 5.19 ppm ($J = 7.5$ Hz).

Les attributions finales des signaux sont dressées dans le tableau II.11.

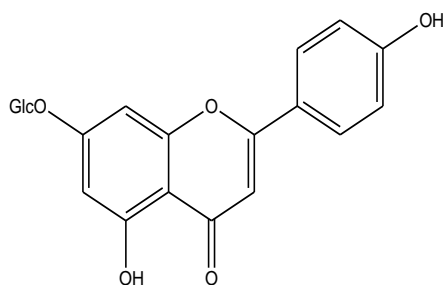
Tableau II.11 : Données RMN- 1 H (250 MHz, DMSO- d_6) du produit F₁₉₋₂₁

Interprétation	δ (ppm), m, J (Hz)	Intégration
H-2', H-6'	7.95, d, 8.9	2H
H-3', H-5'	6.93, d, 8.9	2H
H-6	6.43, d, 2.1	1H
H-8	6.80, d, 2.1	1H
H-3	6.85, s	1H
H-1''	5.19, d, 7.5	1H
Glu	3.26-3.82, m	5H

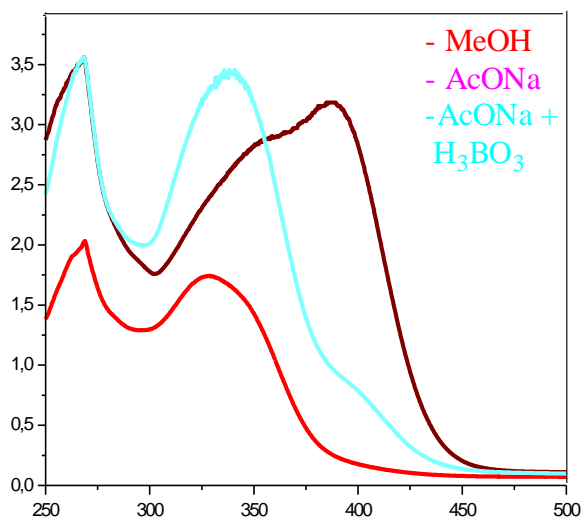
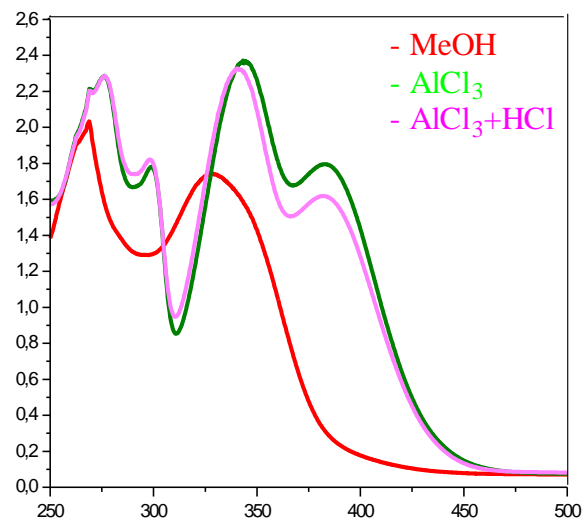
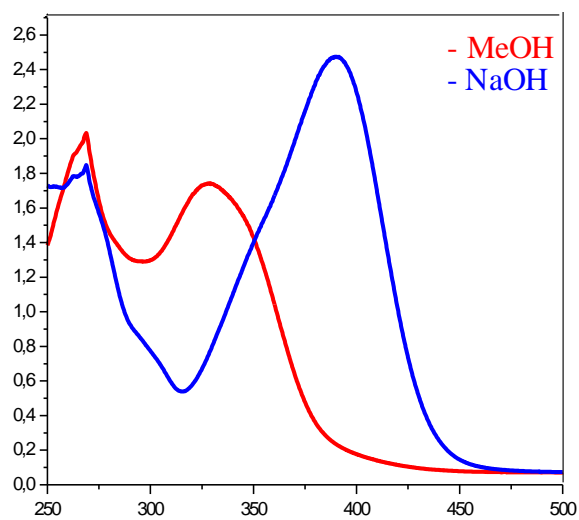
L'hydrolyse acide de ce composé libère le glucose comme sucre identifié par cochromatographie avec un échantillon authentique.

L'aglycone obtenue donne une fluorescence violette sous UV (365 nm) confirmant la jonction sucre aglycone en position 7.

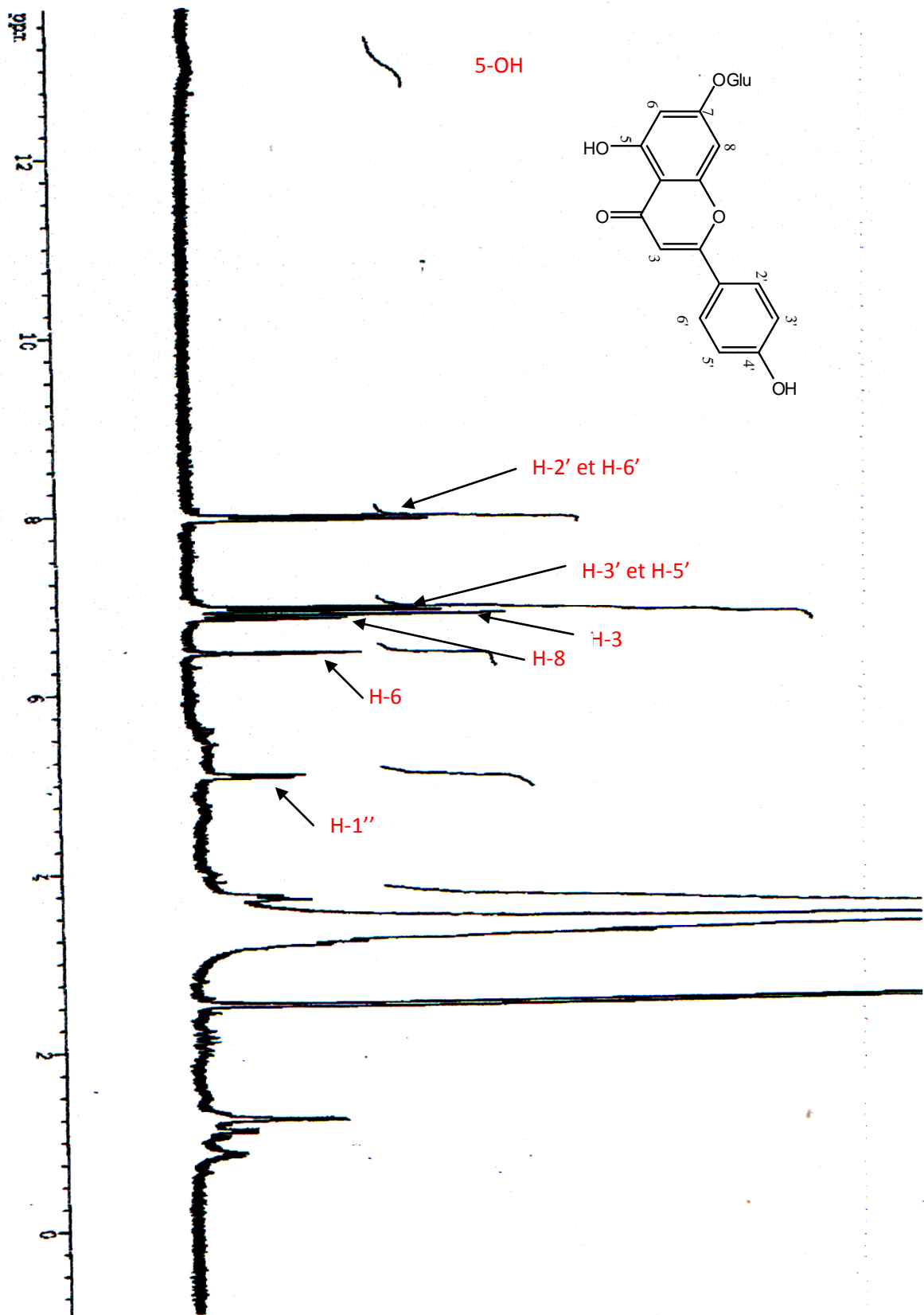
Ces données nous amènent à conclure que le composé F₁₉₋₂₁ correspond au 7-O-glucosylapigénine.



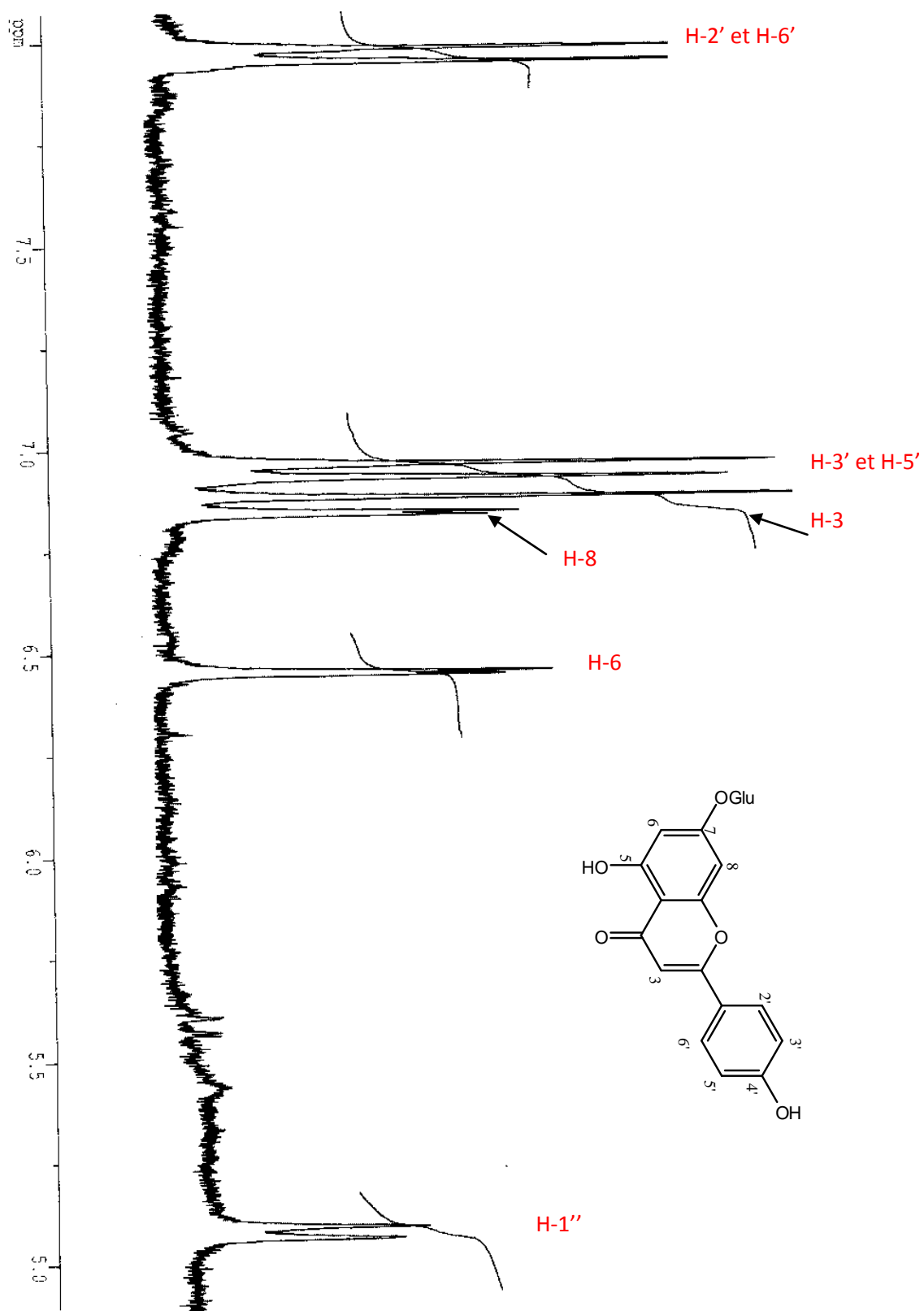
7-O- β -glucosylapigénine



Spectres d.1 : spectre UV-visible du produit F₁₉₋₂₁.



Spectre d.2. : Spectre RMN ¹H du produit F₁₉₋₂₁.



Spectre d.3 : Spectre RMN ^1H étalé (5 à 8 ppm) du produit F_{19-21} .

e. Elucidation de la structure du composé F₂₃

• Propriétés physico-chimiques

- Poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : violette.
- Révélation en CCM : Réactif de Neu (jaune fluorescent sous lampe UV).

• Données spectroscopiques

Tableau II.12: Données spectroscopiques UV-visible du produit F₂₃.

Réactif de déplacement	λ_{\max} (nm)				
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Déplacement	Interprétation
MeOH	346	-	258	-	Flavone ou flavonol substitué en 3.
NaOH (base forte)	410	-	269	+ 64	OH libre en 4' OH substitué en 7
AlCl ₃	420	-	274	+ 74	OH libre en 5
AlCl ₃ + HCl	386	-	270	-	Existence d'ortho di-OH sur le cycle B
AcONa (base faible)	409	-	262	-	Pas de OH libre en 7
AcONa / H ₃ BO ₃	372	-	259	+ 26	3',4'-di-OH sur le cycle B

Tableau III.13 : Données RMN-¹H (250 MHz, DMSO-d₆) du produit F₂₃

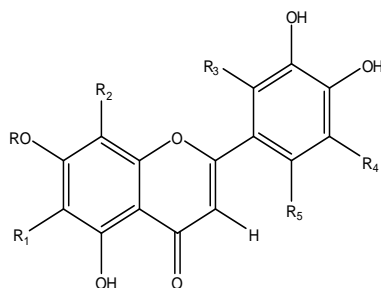
Interprétation	δ (ppm), m, J (Hz)	Intégration
H-2'	7.48, d, 2.2	1H
H-6'	7.43, dd, 2.2 et 8.2	1H
H-5'	6.91, d, 8.2	1H
H-6	6.45, d, 2.2	1H
H-8	6.80, d, 2.2	1H
H-3	6.77, s	1H
H-1''	5.09, d, 7.12	1H
Glu	3.71-3.00	5H

• Interprétation des résultats

La fluorescence violette sous lampe de Wood indique un squelette flavone confirmé par le spectre UV effectué dans le méthanol permettant d'observer deux bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\max} = 258$ nm et l'autre à $\lambda_{\max} = 346$ nm. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome

($\Delta\lambda = + 64$ nm) indiquant la présence d'un OH en 4'. L'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm suggère la présence d'un OH substitué en 7. L'effet hypsochrome ($\Delta\lambda = - 34$ nm) observé après addition de HCl au système MeOH + AlCl₃ indique la présence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 26$ nm) observé après addition de H₃BO₃ au système MeOH + AcONa (Tableau II.12, spectre e.1).

Ces données permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit **F₂₃**.



Dans le spectre RMN ¹H du produit **F₂₃**, on observe un doublet résonant à $\delta = 7.48$ ppm ($J = 2.2$ Hz) et un doublet de doublet à $\delta = 7.43$ ppm ($J = 8.2$ et 2.2 Hz) respectivement dues aux protons H-2' et H-6', un doublet due à H-5' apparaissant à $\delta = 6.91$ ppm ($J = 8.2$ Hz) et deux doublets résonant à $\delta = 6.80$ ppm ($J = 2.2$ Hz) et $\delta = 6.45$ ppm ($J = 2.2$ Hz) attribués respectivement à H-8 et H-6. Le singulet observé à $\delta = 6.77$ ppm est du à la résonance de H-3. L'apparition d'un doublet à $\delta = 5.09$ ppm ($J = 7.1$ Hz) caractéristique d'un proton anomérique et de signaux entre $\delta = 3.71$ et 3.00 ppm indiquent la présence d'un sucre lié à la 5,3',4'-trihydroxyflavone par le carbone-7. La constante de couplage ($J = 7.1$ Hz) observée pour le proton anomérique de **F₂₃**, suggère une liaison de configuration β entre le sucre et la génine.

La présence du groupement glucosyle est confirmée par la RMN ¹³C qui permet de distinguer les signaux suivants : 100.2 (C-1''), 73.5 (C-4''), 76.7 (C-3''), 69.9 (C-5''), 77.5 (C-2''), 61.0 (C-6''), en plus des signaux caractéristiques des carbones flavoniques.

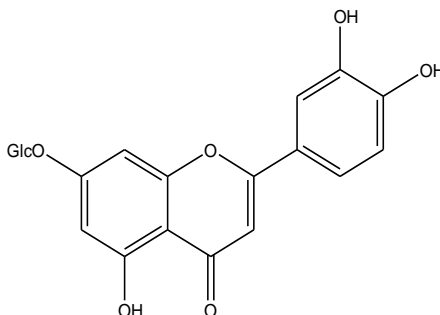
L'hydrolyse acide de ce composé libère le glucose comme sucre identifié par cochromatographie avec un échantillon authentique.

Les attributions finales des signaux sont dressées dans le tableau II.14.

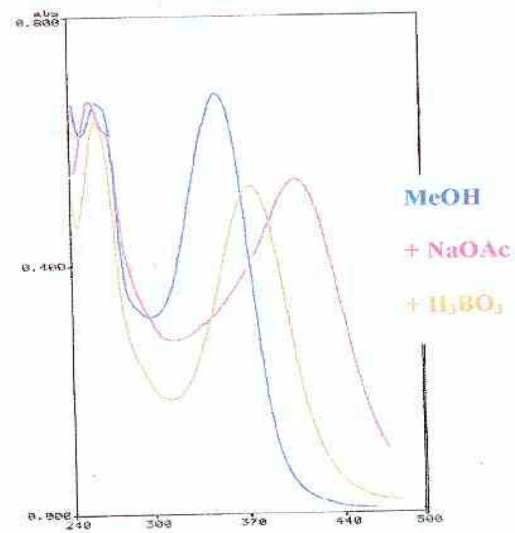
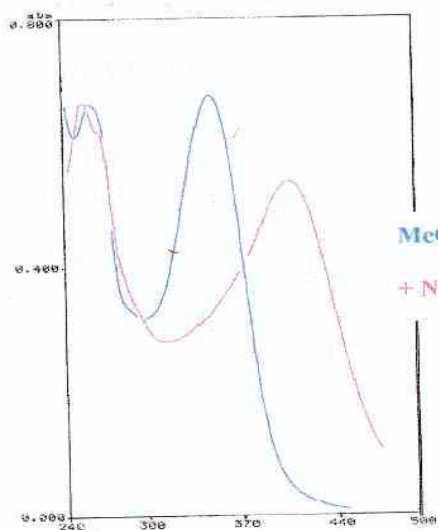
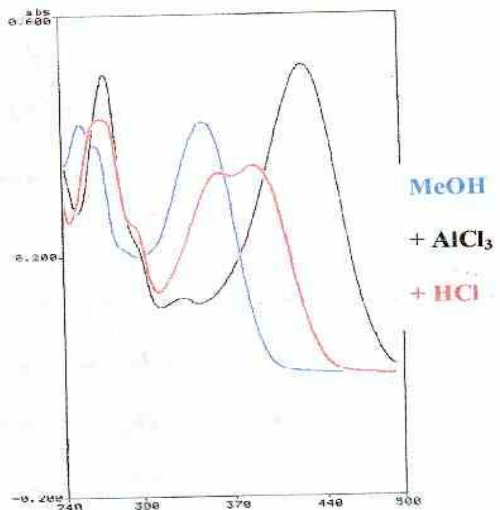
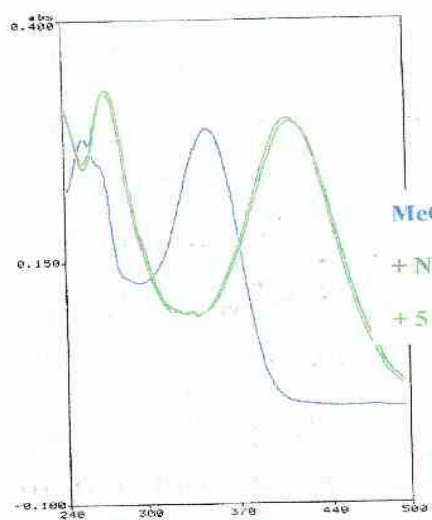
Tableau II.14 : Données RMN-¹³C (250 MHz, DMSO-d₆) du produit F₂₃

Interprétation	δ (ppm)	Interprétation	δ (ppm)
C-2	163.3	C-3'	146.2
C-3	105.7	C-4'	150.3
C-4	182.3	C-5'	118.3
C-5	161.5	C-6'	119.6
C-6	99.9	C-1''	100.2
C-7	164.8	C-2''	77.5
C-8	95.1	C-3''	76.7
C-9	157.3	C-4''	73.5
C-10	103.5	C-5''	69.9
C-1'	121.7	C-6''	61.0
C-2'	113.9		

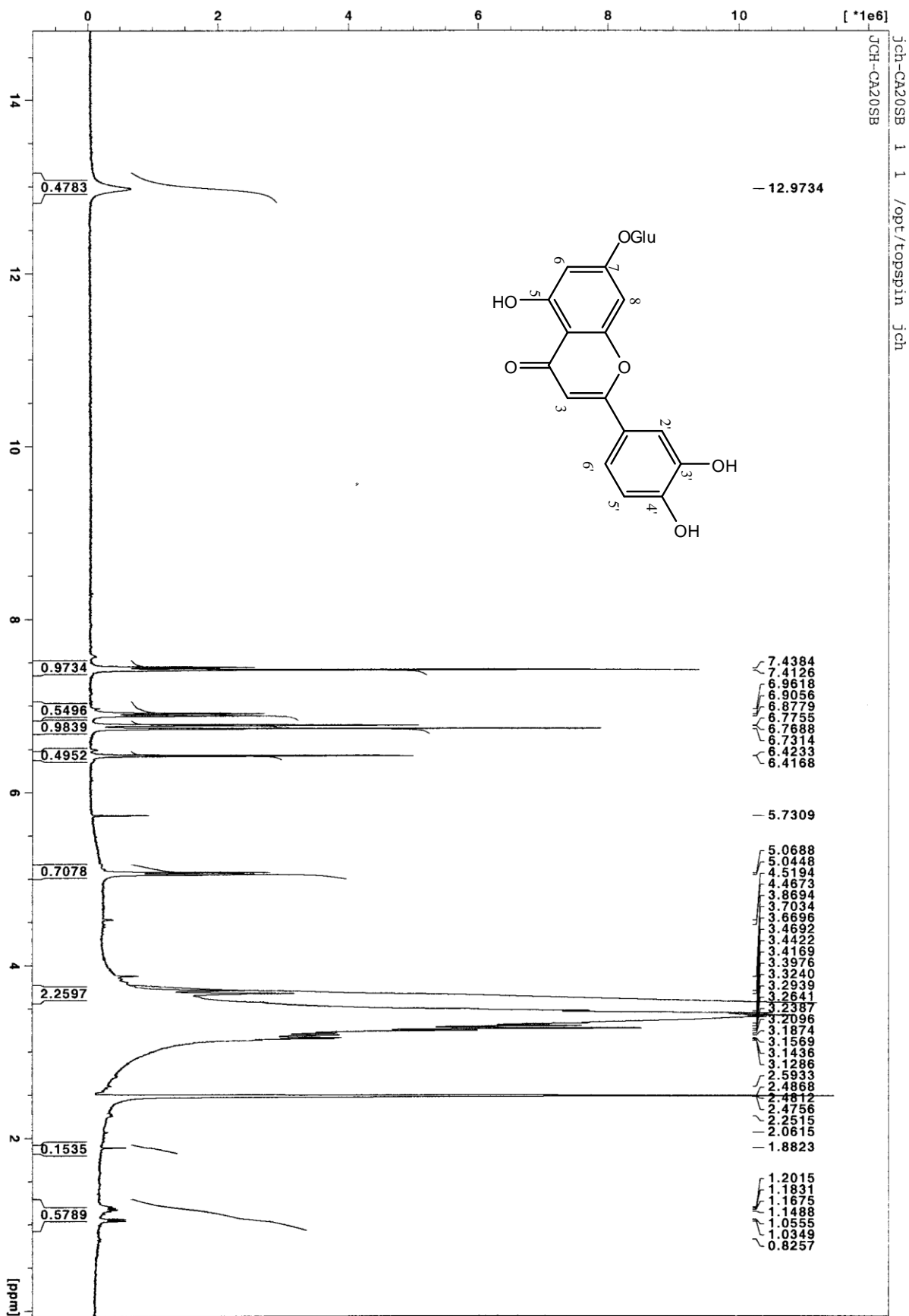
L'ionisation chimique donne un pic moléculaire à $m/z = 449$ (Spectre e.5), suggérant la formule brute C₂₁H₂₀O₁₁. L'ensemble de ces données permet d'attribuer au flavonoïde considéré la structure : **7-O-β-D-glucosyl-5, 3',4'-trihydroxyflavone** ou (7-O-β-D-glucosyllutéoline).



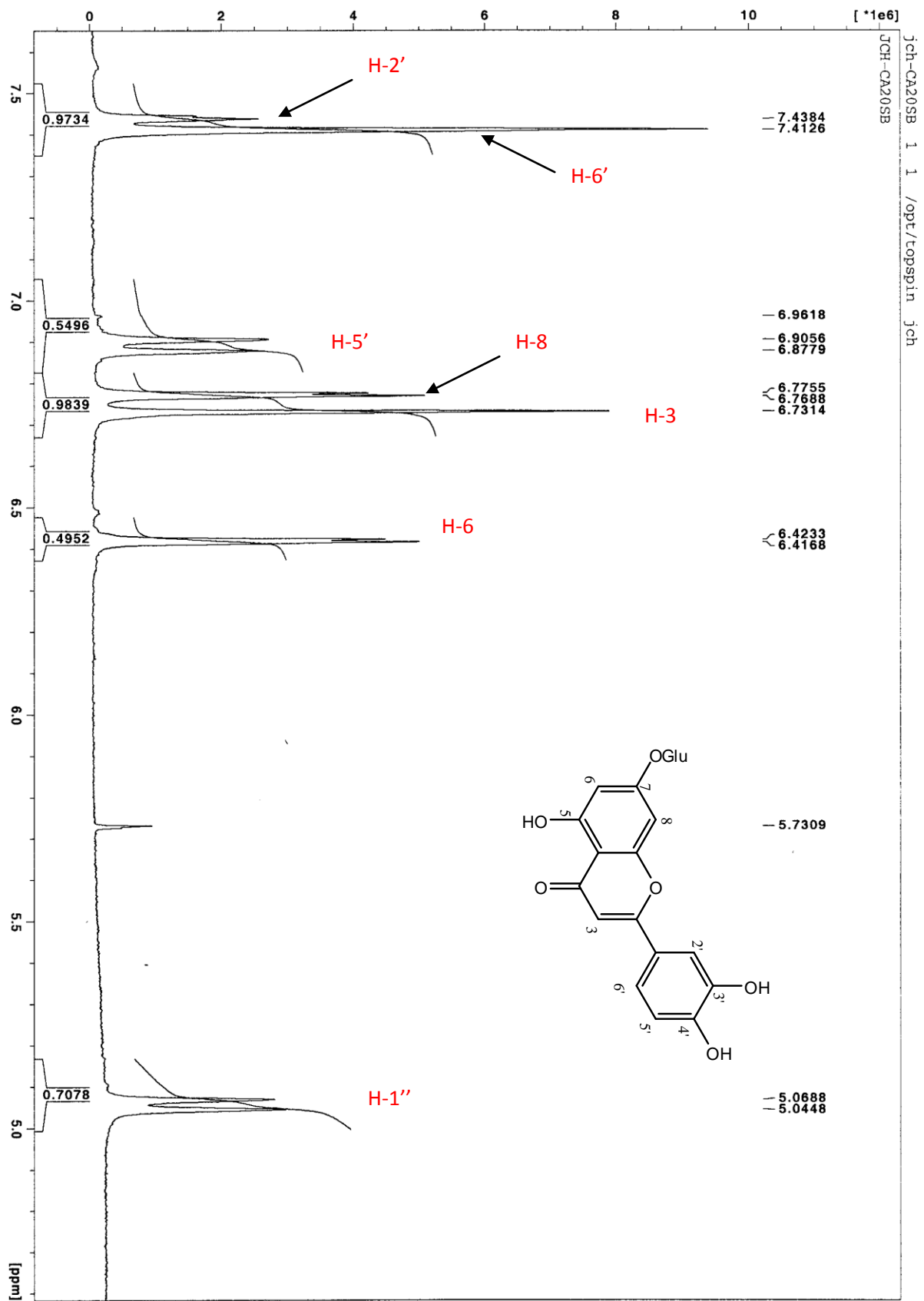
7-O-β-glucosyllutéoline



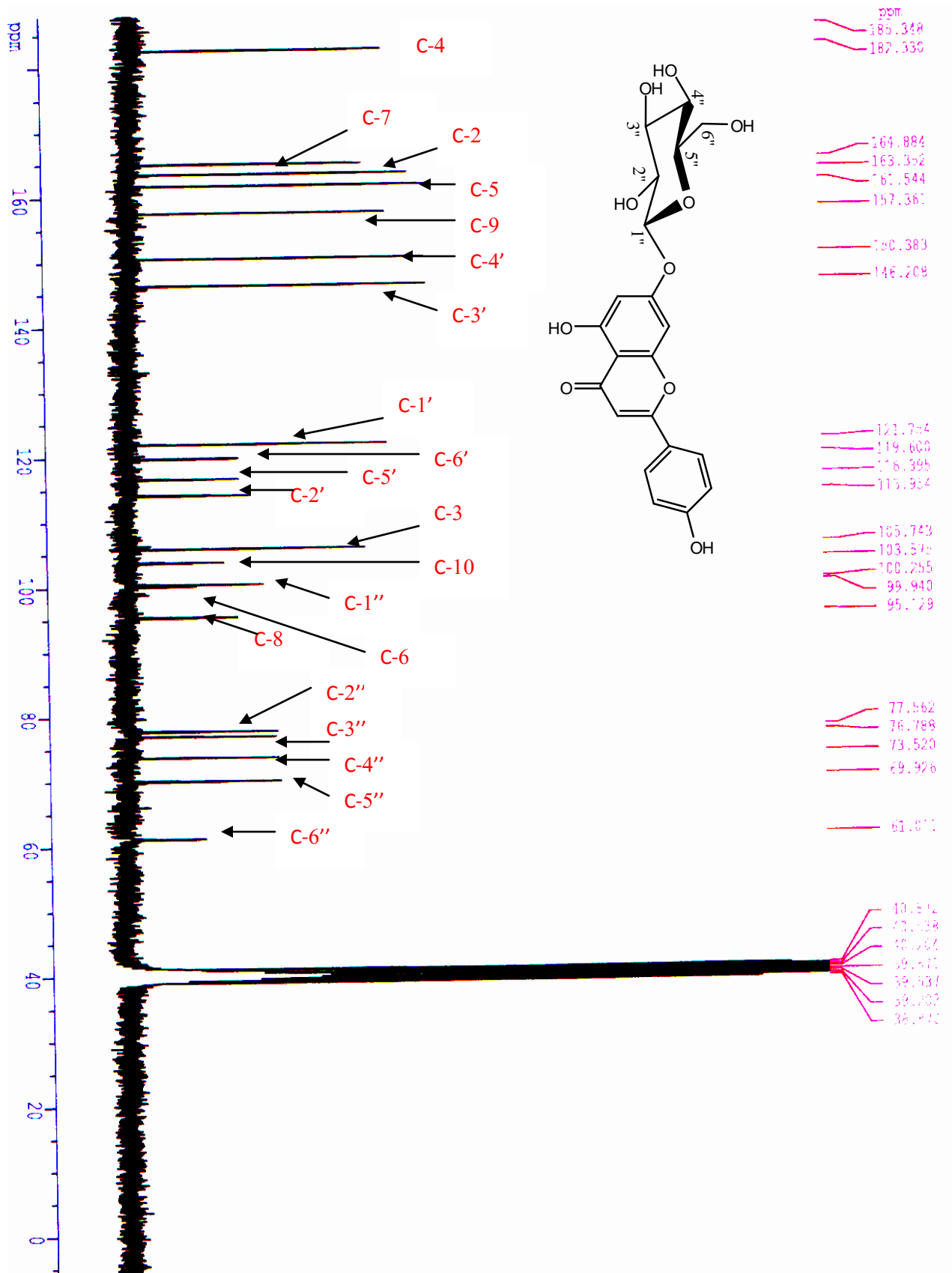
Spectre e.1 : spectres UV-visibles du produit F₂₃



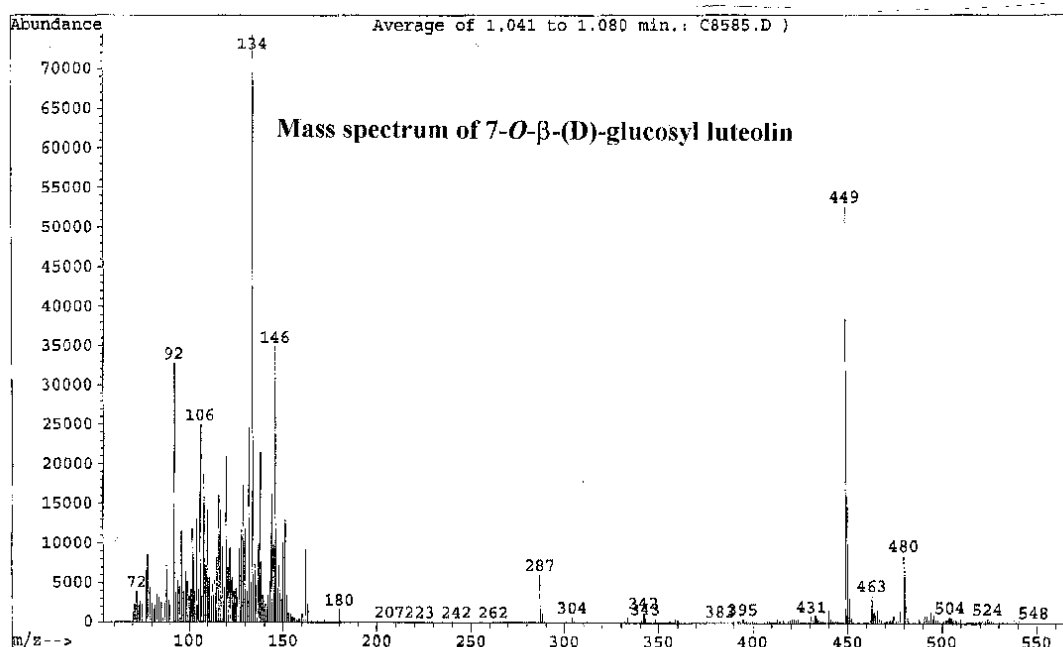
Spectre e.2: Spectre RMN ¹H du produit F₂₃



Spectre e.3 : Spectre RMN ¹H étalé (6 à 8 ppm) du produit F₂₃



Spectre e.4 : Spectre RMN ¹³C du produit F₂₃



Spectre e.5 : Spectre de masse du produit F₂₃

f. Elucidation de la structure du composé F₅₀

• Données spectrales UV

Tableau II.15: Données spectrales UV

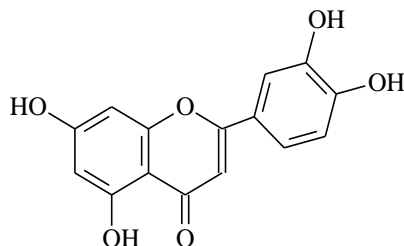
Réactifs	λ_{\max} (nm)		
	Bande I	Autres bandes	Bande II
MeOH	346		256
NaOH	400	325	269
AlCl ₃	420		271
AlCl ₃ +HCl	384		273
NaOAc	402		269
NaOAc+H ₃ BO ₃	375		260

• Interprétation des résultats

Le produit F₅₀ a donné une fluorescence violette sous lampe de wood. Le spectre UV effectué dans le méthanol (Tableau II.15) permet d'observer 2 bandes d'absorption, l'une à $\lambda_{\max} = 256$ nm et l'autre à $\lambda_{\max} = 346$ nm indiquant un squelette de flavone. L'addition de NaOH induit un effet bathochrome ($\Delta\lambda = 54$ nm) indiquant la présence d'un OH en 4'. L'apparition d'une nouvelle bande à $\lambda_{\max} = 325$ nm montre la présence d'un OH libre en 7. L'effet hypsochrome ($\Delta\lambda = -36$ nm) observé après addition de HCl au système MeOH + AlCl₃ suggère la présence d'un système 3', 4'-dihydroxy sur le cycle B. Ceci est confirmé par l'effet bathochrome ($\Delta\lambda =$

29 nm) du spectre obtenu après addition de H_3BO_3 au système MeOH + AcONa. L'effet bathochrome ($\Delta\lambda = 38$ nm) observé après addition de $AlCl_3 + HCl$ à la solution neutre indique la présence d'un OH libre en 5 (Tableau II.15, spectre f.1).

Ces données permettent de suggérer le squelette général suivant pour le produit F_{50} :



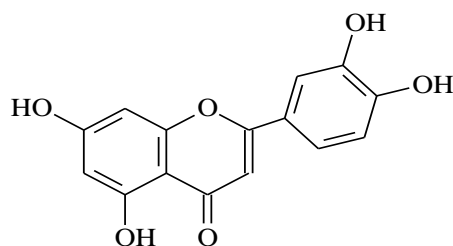
Le spectre RMN du proton enregistré dans CD_3COCD_3 à 400 MHz montre la présence de 3 doublets s'intégrant pour 3 protons, respectivement à 7.38, 6.39, 6.12 ppm ($J = 2.0$ Hz), caractéristiques des protons en couplage méta ($H_{2'}$, H_8 et H_6), un doublet à 6.87 ppm ($J = 8.2$ Hz), attribué à $H_{5'}$ et un doublet de doublet à 7.35 ppm ($J = 8.2$ et 2.0 Hz), caractéristique du proton $H_{6'}$ (Tableau II.16).

Tableau II.16: Données RMN 1H dans CD_3COCD_3 à 400 MHz

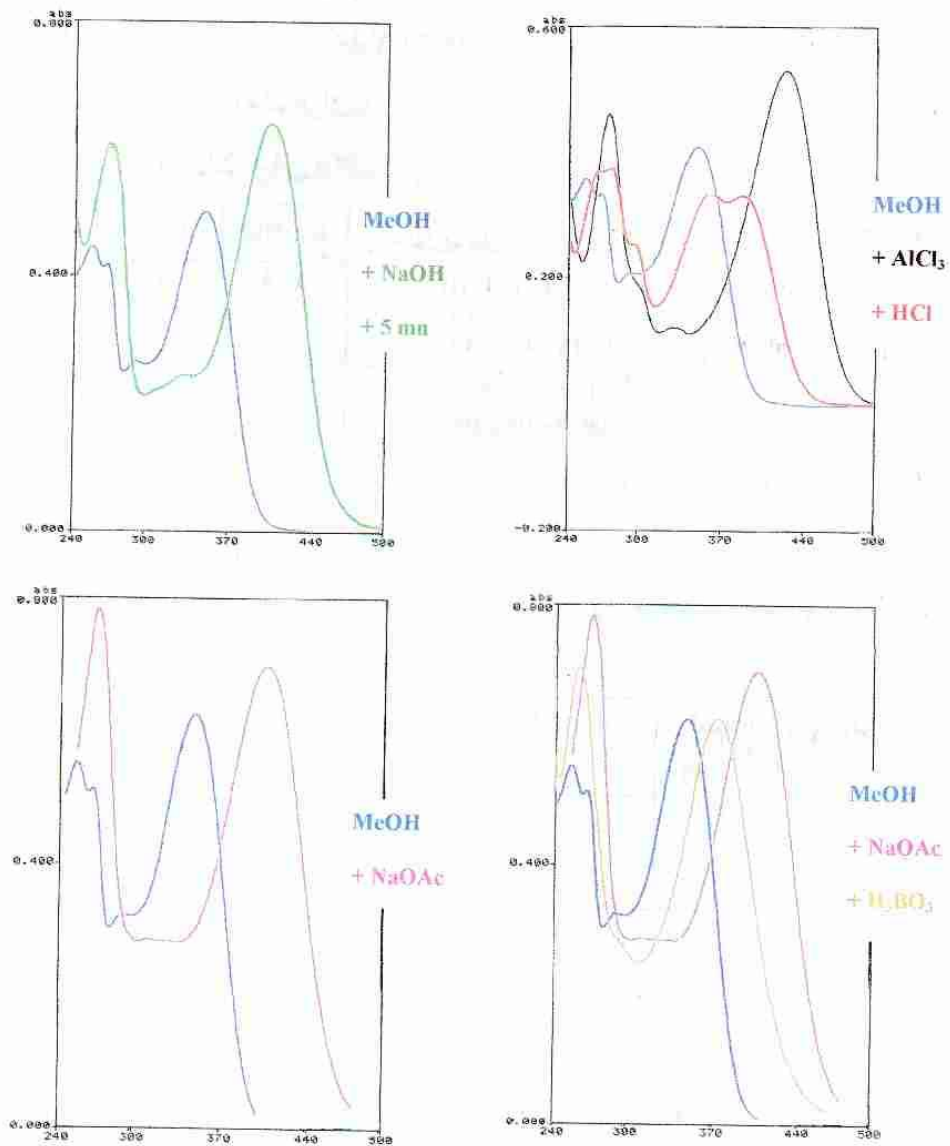
δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage J (Hz)	Attribution
6.12	1H	d	2.0	H_6
6.39	1H	d	2.0	H_8
6.45	1H	s	-	H_3
6.87	1H	d	8.2	$H_{5'}$
7.35	1H	dd	8.2 et 2.0	$H_{6'}$
7.38	1H	d	2.0	$H_{2'}$

Le spectre de masse enregistré en mode d'ionisation chimique permet d'observer le pic moléculaire à $m/z = 287 [M+H]^+$ correspondant à la formule brute $C_{15}H_{10}O_6$ (Spectre f.5)

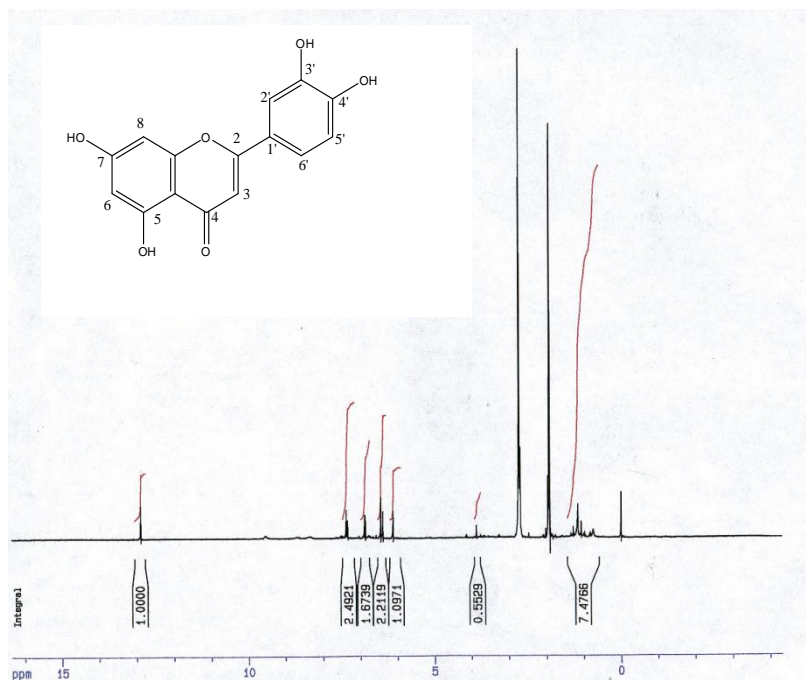
Les données spectroscopiques (UV, RMN, masse) permettent d'identifier la structure de la 5, 7,3',4'-trihydroxyflavone (ou lutéoline) du produit F_{50} :



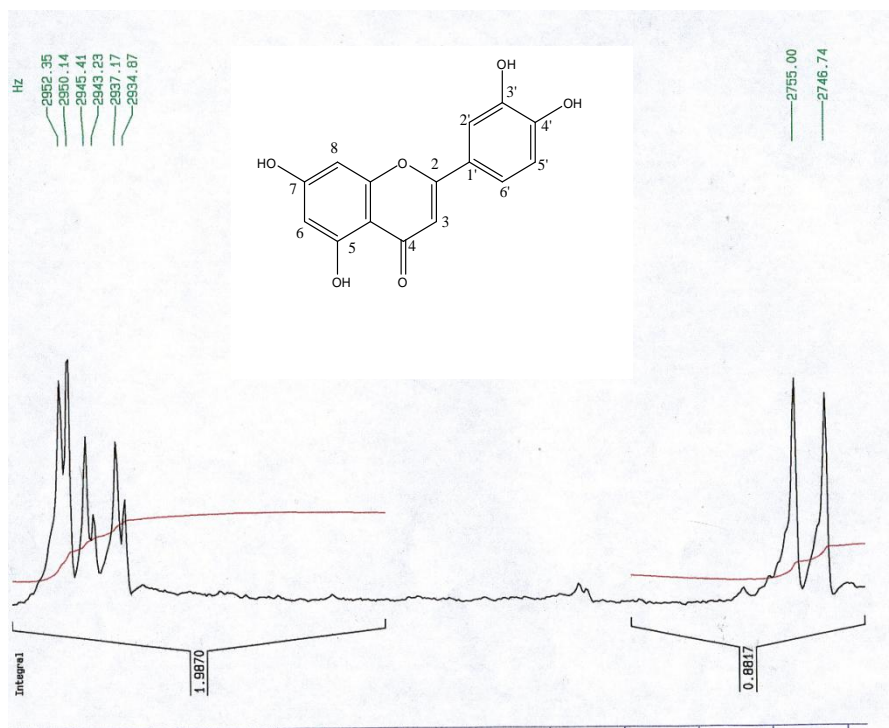
Lutéoline



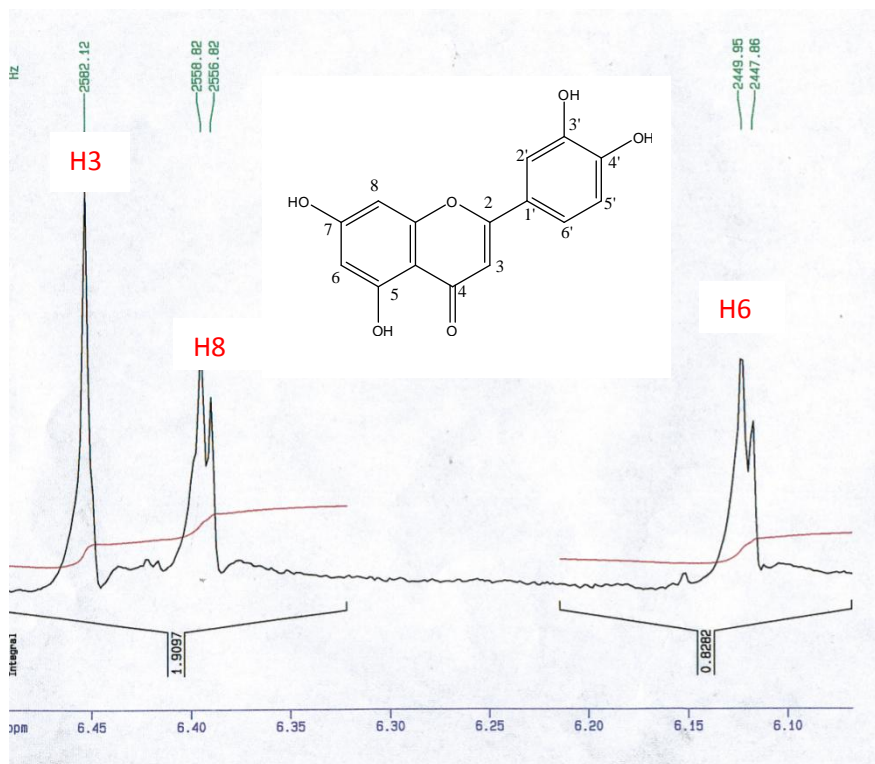
Spectre f.1: Spectres UV du produit F₅₀



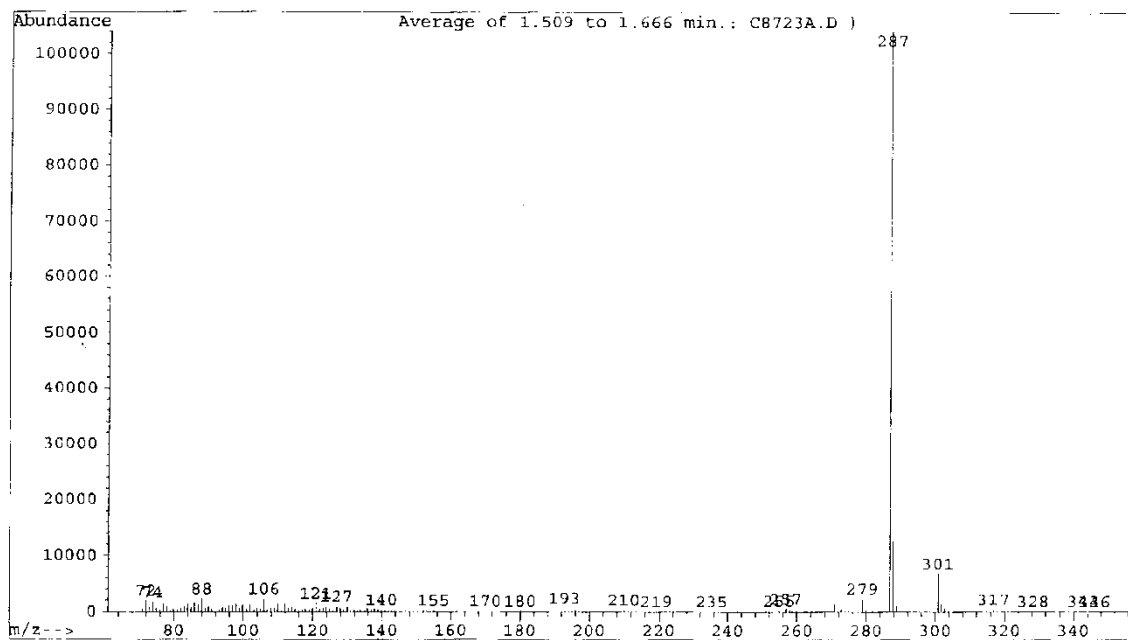
Spectre f.2: RMN ^1H du produit F $_{50}$



Spectre f.3 : RMN ^1H étalé du produit F $_{50}$



Spectre f.4: RMN¹H étalé du produit F₅₀



Spectre f.5 : Masse du produit F₅₀

Références bibliographiques

1. **Markham, K. R., 1982.** Techniques of flavonoids identification. Academic press, London .
2. **Voirin, B., 1983.** Phytochemistry, 22 (10): 2107.
3. **Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970.** Systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, p 254.

III.1. Aperçu bibliographique

III.1.1. Description botanique du genre *Asteriscus*

Le genre botanique méditerranéen *Asteriscus* appartient à la famille des Asteraceae, les fleurs (ou fleurons) sont groupées sur un capitule entouré d'un involucre de bractées. Elles sont de couleur jaune, les périphériques ligulées, celles du disque central tubulées. Les feuilles, simples, sont alternes, plus ou moins lancéolées. Les bractées, semblables aux feuilles supérieures, se terminent par une pointe ou par une épine.

III.1.2. Présentation de l'espèce *Asteriscus maritimus*

Appelée en Algérie « Kerkeba », originaire du Portugal, de la Méditerranée occidentale, la Grèce et les îles Canaries. On la retrouve à l'état sauvage principalement dans les zones arides et rocheuses et sur les falaises du bord de mer. De son vrai nom *Odontospermum maritimum*, il s'agit d'une petite vivace à tiges très ramifiées, qui portent un feuillage persistant vert bleuté et se couvrent d'avril à septembre d'une multitude de jolies fleurs d'un jaune soleil. Elle reste basse (25 cm environ) et résiste également à la sécheresse [1]. Une plante trop peu employée, idéale pour les jardins secs, comme couvre sol ou en bordure.

III.1.3. Classification dans la systématique botanique

Royaume	Plantes
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermatophytes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Astériidae
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae
Sous famille	Asteroideae
Genre	<i>Asteriscus</i>
Espèce	<i>Asteriscus maritimus</i>

III.1.4. Flavonoïdes isolés du genre *Asteriscus*

Le genre *Asteriscus* a fait l'objet de certaines études de la composition chimique, le criblage de différents constituants a commencé par la détermination des sesquiterpènes lactones (Asteriscunolides A–D, Aquatolide, Naupliolide.....etc. isolés à partir de plusieurs espèces (*A. aquaticus*, *A. graveolens*, *A. sericeus*, *A. vogelii*, [2-5], *A. schimperi* [6] et *A.*

pygmaeus) [7]. Quelques flavonoïdes ont été isolés à partir du genre *Asteriscus* (L'espèce *A. graveolens*) (Tableau III.1.)

Tableau III.1. : Flavonoïdes isolés du genre *Asteriscus*

Flavonoïdes	Plantes	Réf.
Luteoline 7-o-glucoside	<i>Asteriscus graveolens</i>	[8]
Luteoline 3-o-glucoside		
Luteoline 7-o-galactoside		
Kaempferol-7-o-glucoside		
Quercétine 7-o-glucoside		
3,6,3' trimethyl ether queretagine		

III.2. Description des travaux et discussion des résultats

III.2.1. Choix du matériel végétal

La partie aérienne d'*Asteriscus maritimus* (voir figure III.1) a été récoltée de façon aléatoire dans la région côtière (Ain-Achir), Annaba (Algérie). Cette plante a été choisie pour plusieurs critères :

- Elle constitue un patrimoine local floristique très important et qu'elle n'est en grande partie décrite que d'un point de vue botanique.
- L'endémisme de l'espèce *Asteriscus maritimus* de la côte algérienne, dont le climat et le type d'écosystème offre des caractéristiques et des spécificités non négligeables à la végétation.
- Notre intérêt prononcé au genre *Asteriscus* pour sa capacité d'accumulation de molécules (Sesquiterpènes, flavonoïdes etc.....) à activités biologiques potentielles.



Figure III.1: Photographie d'*Asteriscus maritimus*

III.2.2. Protocole expérimental

III.2.2.1. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée au mois d'Avril 2007. Elle a été identifiée par le Professeur Gérard De Bélair (Faculté des sciences, Université Badji-Mokhtar, Annaba). Un échantillon a été déposé au laboratoire d'obtention des substances thérapeutiques (Constantine) sous la référence (LOST/A.m./04/07). Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été pulvérisées et pesées (1000g).

III.2.2.2. Extraction des parties aériennes

1000g de la partie aérienne de la plante pulvérisée sont mis à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (Méthanol/Eau ; 70:30, v/v) pendant 3 jours à la température ambiante.

Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 45°C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits hydro-alcooliques récupérés sont réunis et concentrés. A la solution concentrée obtenue, on ajoute 300ml d'eau. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette décantation permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable, etc.... Après filtration, on obtient une solution aqueuse claire. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (ether de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol).

Les phases organiques récupérées sont séchées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Les rendements d'extraction sont donnés dans le Tableau III.2.

Tableau III.2 : Rendement des extractions

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
1000 g	éther de pétrole	1.3	0.13
	dichlorométhane	20.7	2.07
	acétate d'éthyle	5.33	0.53
	<i>n</i> -butanol	8.20	0.82

Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la figure III.2.

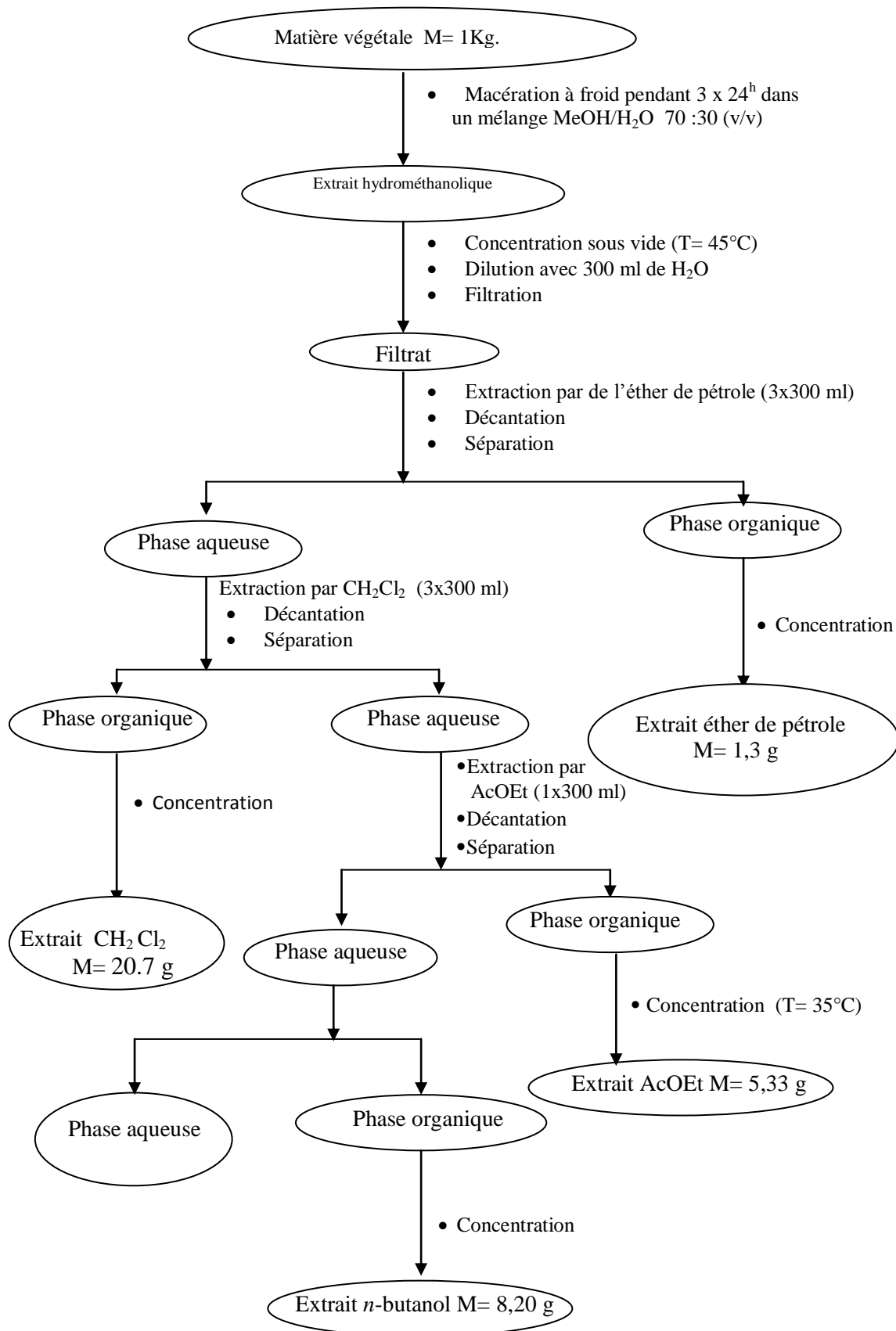


Figure III.2 : Protocole d'extraction des parties aériennes d'*Asteriscus maritimus*

III.2.2.3 Séparation chromatographique

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince pour mettre au point l'éluant ou le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats.

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanolique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium et polyamide, qui a montré que la phase acétate et *n*-butanolique sont très proches. Pour cela, notre choix s'est basé sur la phase *n*-butanolique.

Une masse de 8.2 g d'extrait *n*-butanolique est déposée sur une colonne de gel polyamide SC₆ préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système toluène-méthanol en commençant par le toluène pur et en terminant par le méthanol pur. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support d'aluminium en utilisant divers systèmes d'élution. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365nm) puis révélées par la vanilline sulfurique.

Les fractions similaires ont été regroupées, évaporées et pesées. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanolique d'*Asteriscus maritimus*.

Lot de fractions	N° de la fraction	Système d'élution		Observation
		% Toluène	% Méthanol	
1-2	F01	100	0	Cires et cristaux blancs
3-19	F02	98	2	Mélange complexe
20-34	F03	96	4	Mélange séparable
35-46	F04	92	8	Mélange séparable
47-60	F05	88	12	Mélange complexe
61-72	F06	85	15	Mélange complexe
73-113	F07	80	20	Mélange séparable
114-139	F08	75	25	Mélange séparable
140-162	F09	70	25	Mélange séparable
163-187	F10	60	30	Mélange séparable
188-194	F11	55	45	Mélange complexe
195-200	F12	45	55	Mélange complexe
201-209	F13	20	80	Mélange complexe
210-216	F14	0	100	Mélange complexe

Le regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-butanolique a été testé sur des plaques CCM analytiques de gel de silice en utilisant divers systèmes d'élution.

Parmi les 14 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions F07, F08, F09 et F10 et ce, soit pour leur simplicité, soit pour leur poids relativement important.

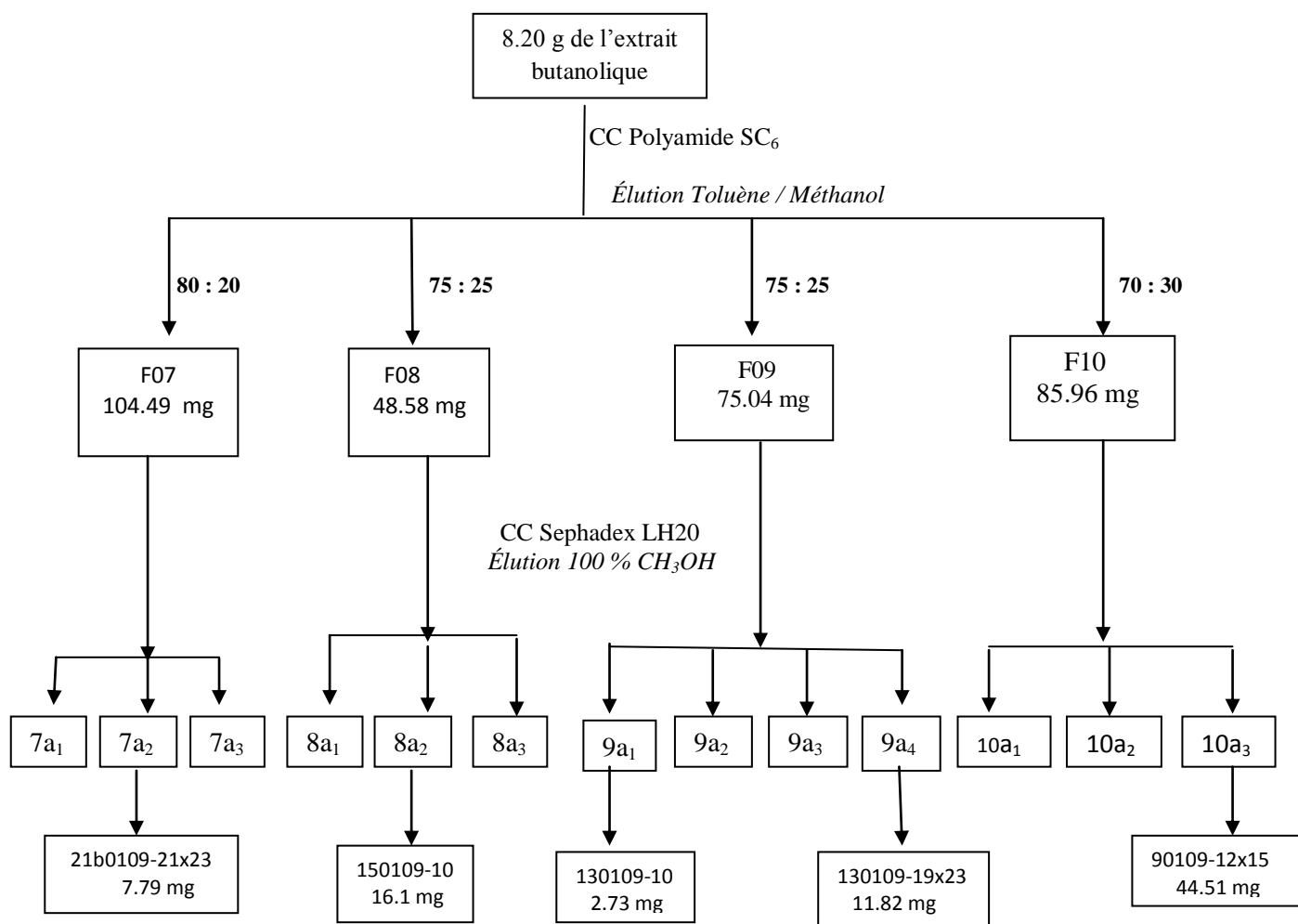
Après rassemblement selon les résultats du suivi analytique, les fractions ont été purifiées par chromatographie sur colonne de séphadex LH-20 et éluées par le méthanol filtré.

La séparation par chromatographie sur colonne a été suivie par un contrôle des fractions sur des plaques CCM analytiques de gel de silice en utilisant le système de séparation (Acétate d'éthyle/ acide acétique/ acide formique/ eau : 80/5/5/10).

L'examen des plaques est réalisé sous lumière UV à 254 nm et 365nm, Les sous fractions similaires ont été regroupées, évaporées et pesées.

Trois sous fractions ont été obtenues séparément à partir de F07, F08 et F10, par contre la fraction F09 a donné quatre sous fractions.

La progression de cette colonne est rassemblée dans l'organigramme suivant :



Une seule bande de fluorescence jaune sous lampe Wood a été séparée, purifiée sur colonne de séphadex LH 20 à partir des sous-fractions 7a₁, 8a₁, 9a₄ et 10a₃; une fluorescence violette caractérise la sous fraction 9a₁.

L'utilisation de cette technique chromatographique a conduit respectivement à l'isolement de cinq produits en état pur : 21b0109-21x23 , 150109-10, 130109-10, 130109-19x23 et 90109-12x15).

Le composé 9010912x15 semble être le constituant majoritaire, présentant une masse de 44,51 mg. Les autres produits présentent des valeurs qui oscillent entre 2,73 et 11,82 mg.

Les sous-fractions restantes se présentent, soit en faible quantité, soit elles ont des R_f très proches et les tentatives de séparations ont échoué.

Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectroscopiques particulièrement la RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC.

III.2.3. Caractérisation chimique et élucidation structurale des composés isolés

a.Elucidation de la structure du composé 150109-10

•Analyses physico-chimiques

- Poudre de couleur jaune fluorescent, Fluorescence sous lampe Wood : Jaune
- R_f= 0,43 dans le système (Acétate d'éthyle/H₂O/MeOH : 9:1:1) et R_f = 0.50 dans le système (Acétate d'éthyle/ acide acétique/ acide formique/ H₂O: 80 :5:5:10)

•Analyses spectroscopiques

Dans le spectre de RMN ¹H du composé 150109-10, enregistré dans le méthanol (Spectre N°a.1), on observe dans la région des aromatiques, la présence de système ABX du cycle B : $\delta_{\text{H}}= 7.74$ ppm (1H, d, $J= 2.2$ Hz, H-2'), $\delta_{\text{H}}= 7.64$ ppm (1H, dd, $J= 8.5$ Hz et $J= 2.2$ Hz, H-6') et $\delta_{\text{H}}= 6.87$ ppm (1H, d, $J= 8.5$ Hz, H-5'), Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'.

Un singulet à $\delta_{\text{H}}= 6.84$ ppm correspond soit au proton H-6 ou au proton H-8, toutefois le spectre HSQC étalé, (Spectre N°a.5) montre que ce proton est corrélé au carbone dont le signal apparaît à $\delta_{\text{C}}= 95.5$ ppm, il ne peut être donc attribué qu'au carbone 8.

La présence d'un méthoxyle est caractérisée par l'apparition d'un singulet à $\delta_{\text{H}}= 3.89$ ppm et confirmée par la RMN du ¹³C (Spectre N°a.2), par l'apparition d'un carbone à $\delta_{\text{C}}= 61.6$ ppm.

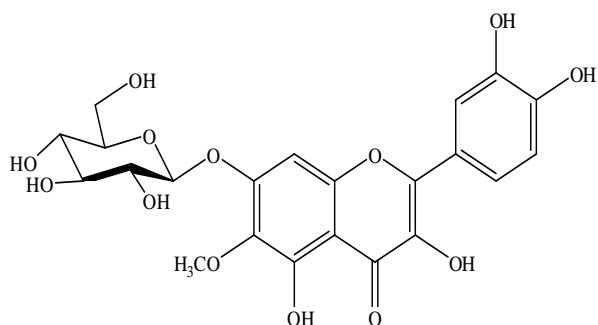
Un groupement glucosyle dont le proton anomérique est observé sous forme de doublet à $\delta_{\text{H}}= 5.1$ ppm ($J= 7.3$ Hz, 1H). Le même spectre permet notamment l'observation d'un signal à $\delta_{\text{C}}= 102.1$ ppm correspondant au carbone anomérique de glucose. La présence de cinq C en RMN du ¹³C à $\delta_{\text{C}}= 74.8$ ppm (C-2"), $\delta_{\text{C}}= 78.6$ ppm (C-3"), $\delta_{\text{C}}= 71.4$ ppm (C-4"), $\delta_{\text{C}}= 78.0$ ppm (C5")

et $\delta_c = 62.6$ ppm (C-6''), permet de confirmer la présence d'un seul sucre, notamment le glucose [9].

L'expérience HMBC (Spectres N°a.7) permet de déterminer les positions des constituants de la molécule. Le signal à $\delta_H = 5.1$ ppm (H-1'') de proton anomérique du glucose est corrélé avec le signal à $\delta_c = 157.7$ ppm (C-7) de l'aglycone, indiquant que la position C-7 de l'aglycone est glycosylée. De plus le signal du méthoxyle à $\delta_H = 3.89$ ppm est corrélé avec le signal C-6 à $\delta_c = 133.4$ ppm du cycle A, indiquant que le groupe méthoxyle est attaché à la position C-6 et non à C-8.

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonance magnétiques nucléaires bidimensionnelles (HSQC, HMBC).

Ces données ont permis d'établir la structure du composé 150109-10 comme étant le 6-méthoxy-7-O- β -glucosyl-quercétine.

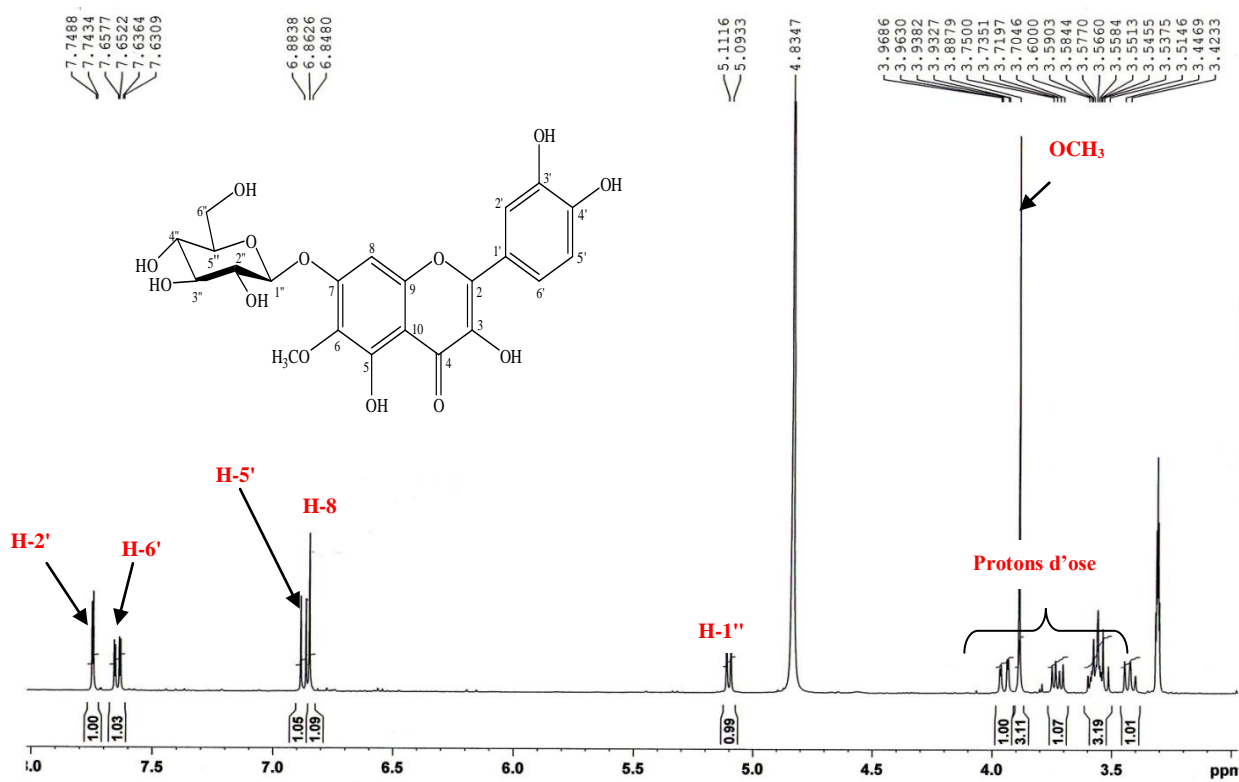


6-méthoxy-7-O- β -glucoside-quercétine

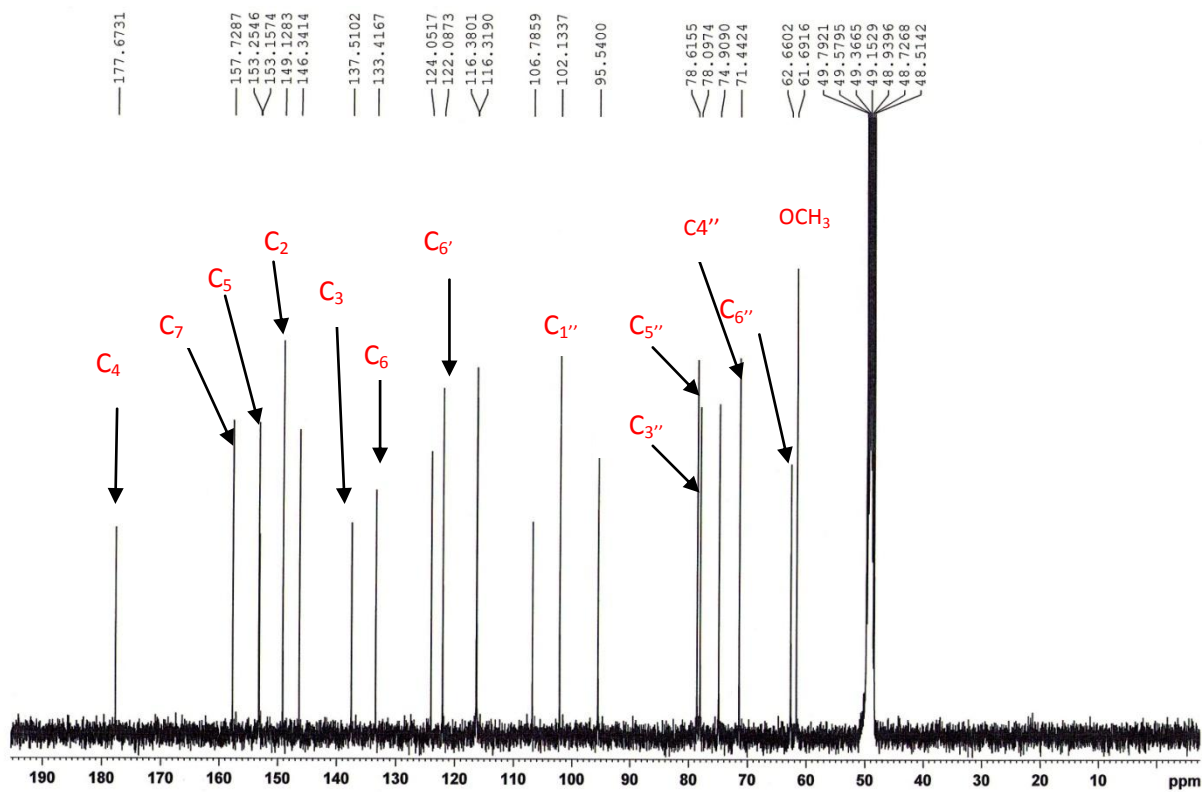
Les données de RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentées dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : RMN du H¹ et du C¹³ (400 MHz, δ , J , en Hz ; 100 MHz, δ) du composé 150109-10 dans le CD₃OD.

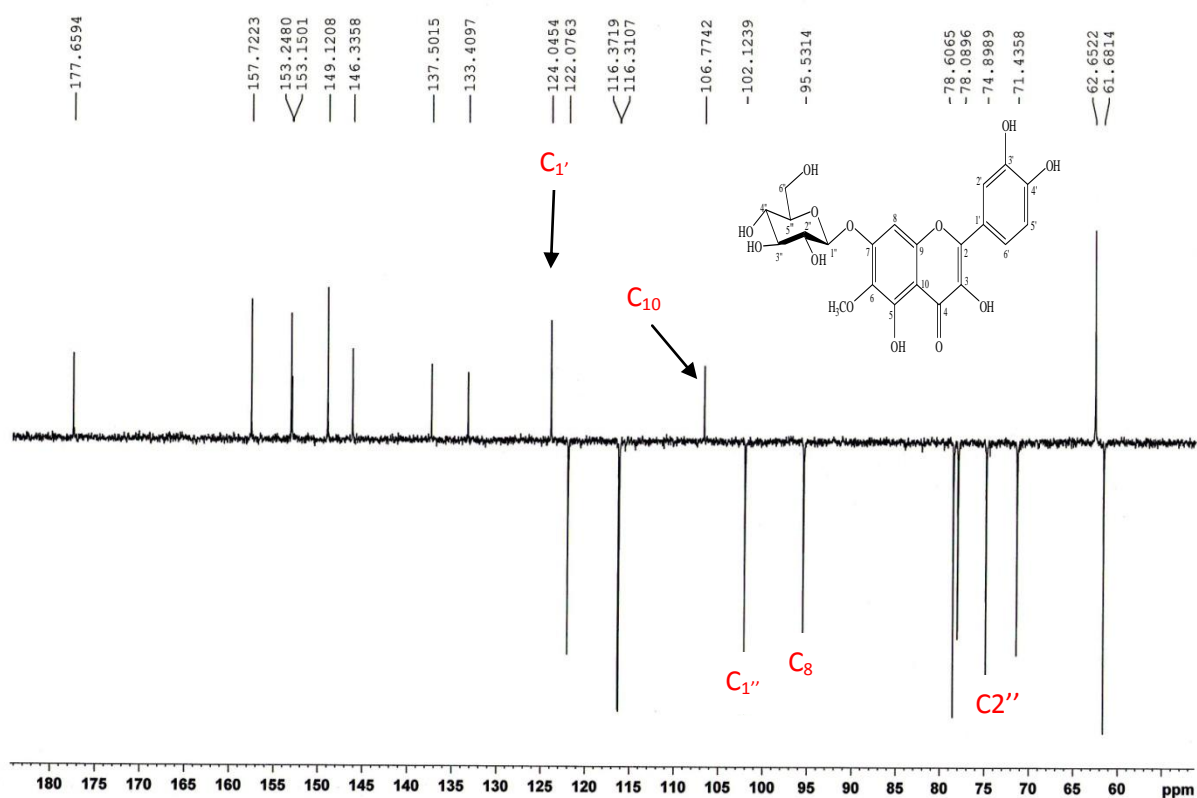
Génine	Composé 150109-10	
	¹ H	¹³ C
	δ (ppm)	
2	-	149.1
3	-	137.5
4	-	177.6
5	-	153.2
6	-	133,4
7	-	157.7
8	6.84 <i>s</i> (1H)	95.5
9	-	153.1
10	-	106.7
1'	-	124.0
2'	7.74 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz, 1H)	153.2
3'	-	146.3
4'	-	149.1
5'	6.87 <i>d</i> ($J= 8.5$ Hz, 1H)	153.2
6'	7.64 <i>dd</i> ($J= 8.5$ Hz, $J= 2.2$ Hz, 1H)	122.0
G ₁ ''	5.1 <i>d</i> ($J= 7.3$ Hz, 1H)	102.1
G ₂ ''	3.58 <i>t</i> ($J= 9.2$ Hz)	74.8
G ₃ ''	3.54 <i>t</i> ($J= 9.2$ Hz)	78.6
G ₄ ''	3.42 <i>brt</i> ($J= 9.4$ Hz ; $J= 9.8$ Hz, 1H)	71.4
G ₅ ''	3.56 <i>m</i>	78.0
G ₆ ''	a: 3.72 <i>dd</i> ($J= 12.2$ Hz ; $J= 6.0$ Hz, 1H) b: 3.95 <i>dd</i> ($J= 12.2$ Hz ; $J= 2.2$ Hz, 1H)	62.6
OCH ₃	3.89 <i>s</i> (3H)	61.6



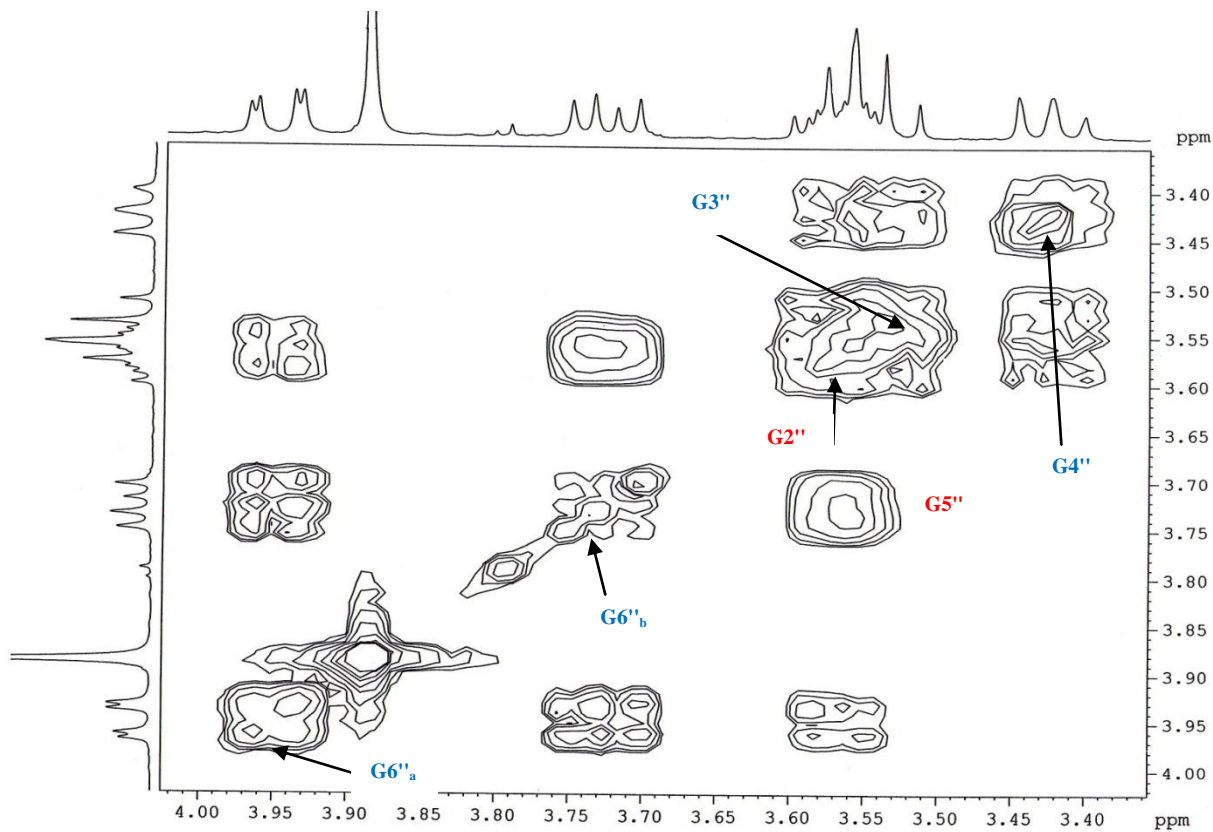
Spectre a.1 : Spectre RMN ¹H du composé 150109-10 (400 MHz, CD₃OD).



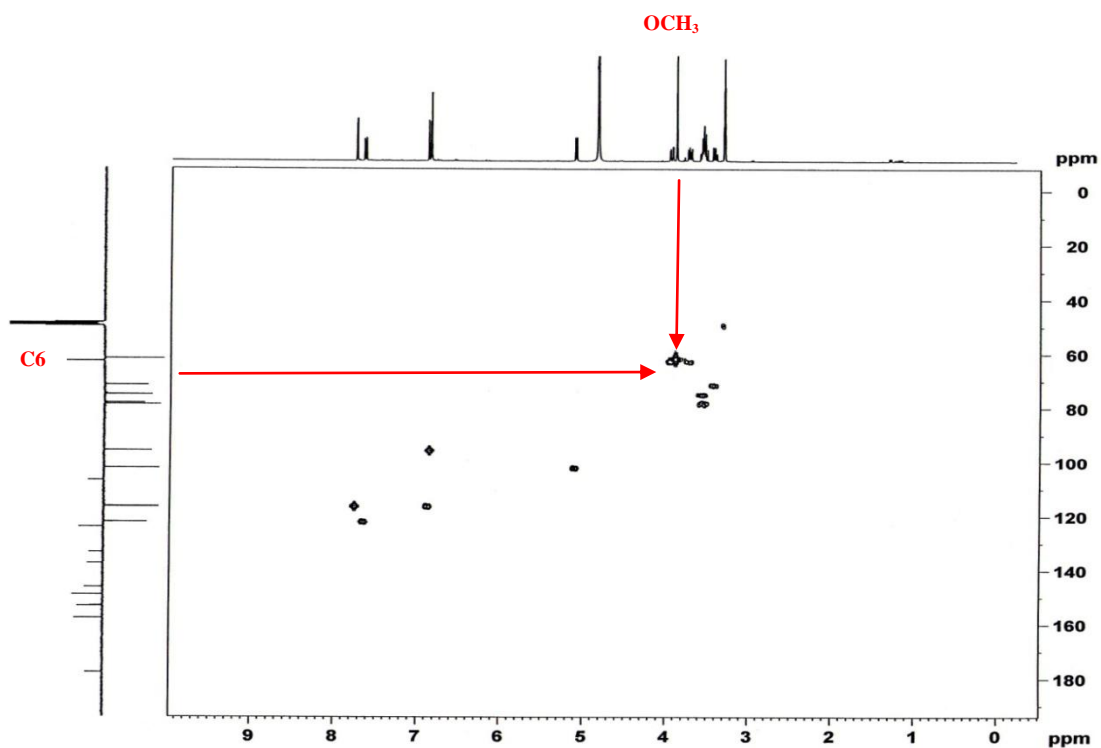
Spectre a.2 : Spectre RMN ¹³C du composé 150109-10 (100 MHz, CD₃OD).



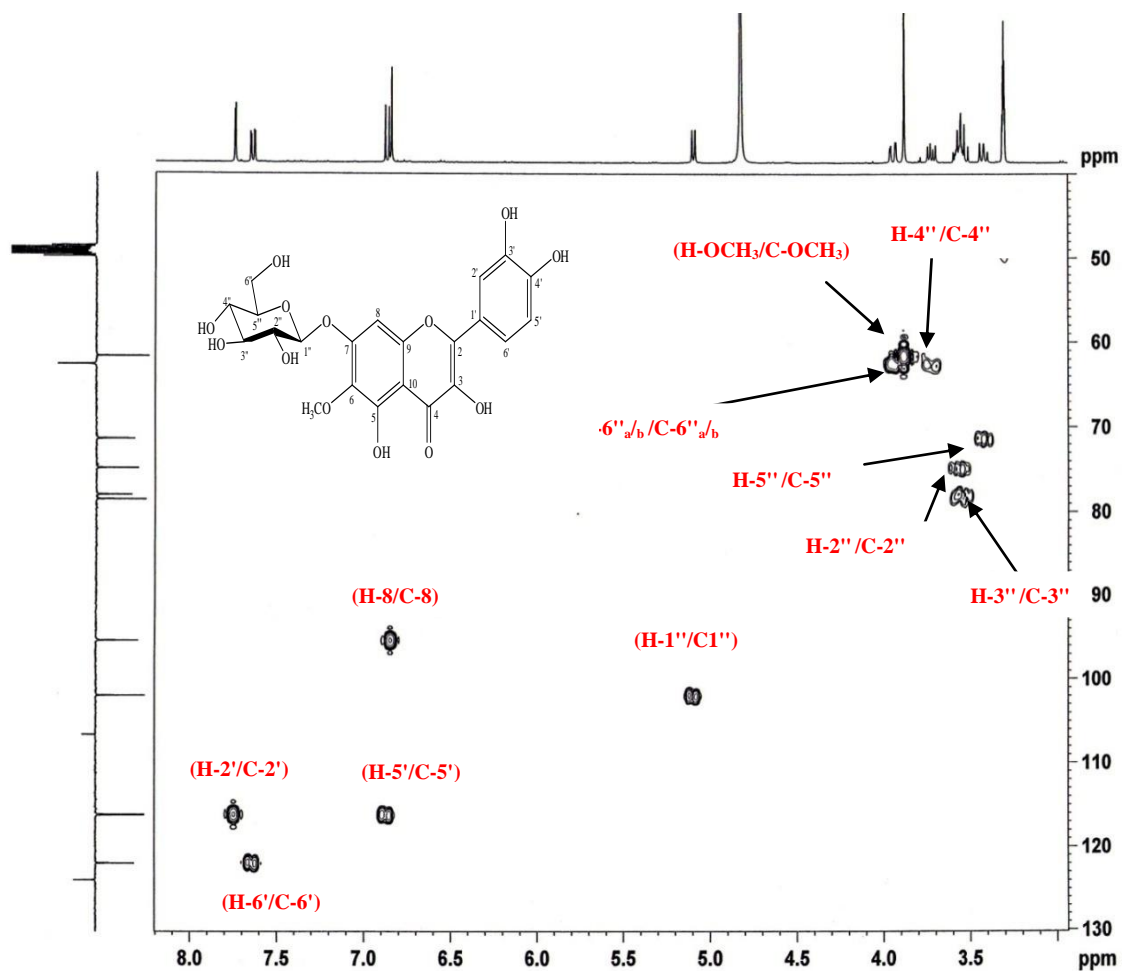
Spectre a.3 : Spectre RMN ¹³C DEPT 135 étalé (60 à 180 ppm) du composé 150109-10 (100 MHz, CD₃OD).



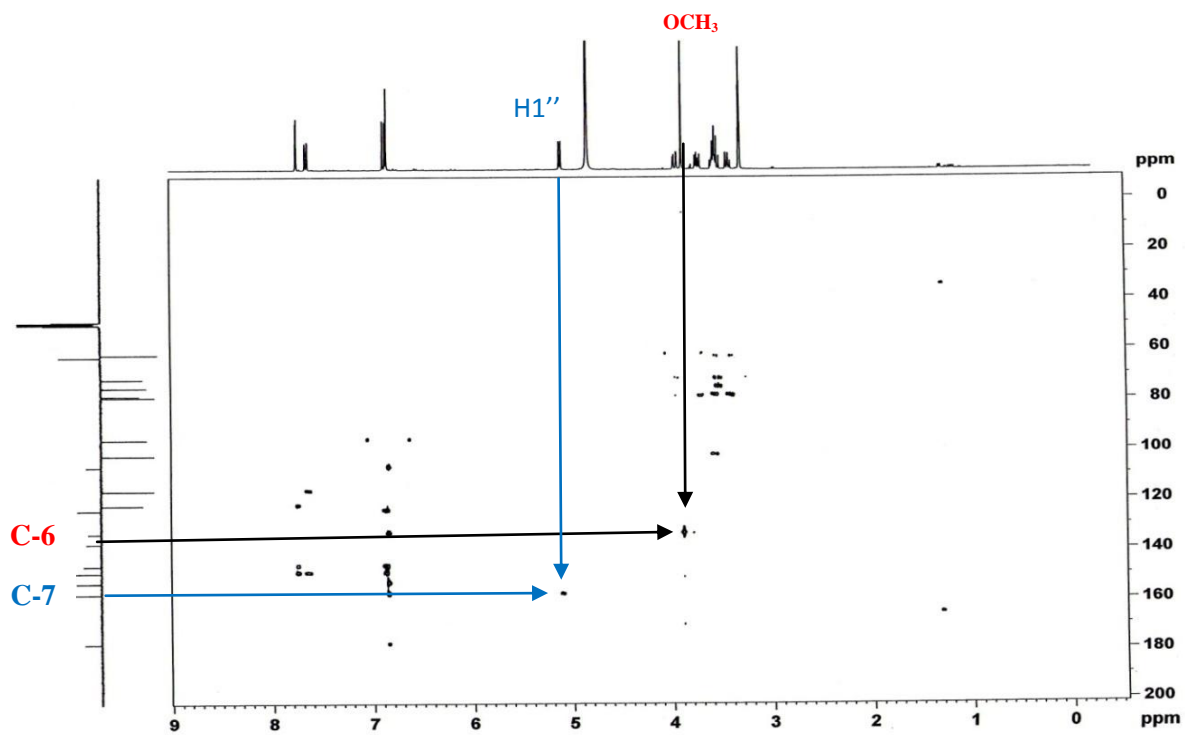
Spectre a.4 : Spectre Cosy étalé (3.4 à 4.0 ppm) du composé 150109-10 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre a.5 : Spectre HMQC du composé 150109-10 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre a.6 : Spectre HMQC étalé (50 à 130 ppm) du composé 150109-10 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre a.7 : Spectre HMBC du composé 150109-10 (400 MHz, CD_3OD).

b. Elucidation de la structure du composé 21 B 0109-21 à 23

•Analyses physico-chimiques

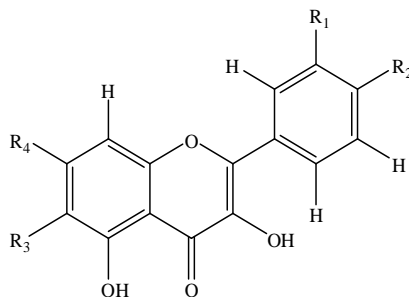
- Fluorescence sous lampe Wood : Jaune.
- $R_f = 0.46$ dans le système (Acétate d'éthyle/ acide acétique/ acide formique/ H₂O: 100 ml/ 5ml/ 5ml/ 10 ml).

•Analyses spectroscopiques

Au niveau du spectre de RMN du ¹H (Spectre b.1), on observe un système ABX : $\delta_H = 6.89$ ppm (d, $J = 8.5$ Hz, H-5') ; $\delta_H = 7.75$ ppm (d, $J = 2.2$ Hz, H-2') ; $\delta_H = 7.64$ ppm (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, H-6'). Ceci indique une disubstitution du cycle B en 3' et 4'. La présence de deux méthyles est caractérisée par l'apparition d'un singulet à $\delta_H = 3.88$ ppm (méthoxy) et d'un doublet à $\delta_H = 1.04$ ppm (méthyle), cela est confirmé respectivement par la RMN du ¹³C (Spectre b.2) par la résonance d'un carbone à $\delta_C = 61.6$ ppm et d'un carbone à $\delta_C = 13.9$ ppm.

Un groupement glucosyle dont le proton anomérique est observé sous forme de doublet à $\delta_H = 5.10$ ppm ($J = 7.3$ Hz). Le singulet résonnant à $\delta_H = 6.84$ ppm est attribué à H-8 de l'aglycone.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :



Quant au spectre de RMN du ¹³C, il permet de distinguer les signaux correspondant au glucose et ceux de la génine. Les déplacements chimiques à $\delta_C = 74.8$ ppm (C-2''), $\delta_C = 77.8$ ppm (C-3''), $\delta_C = 71.7$ ppm (C-4''), $\delta_C = 75.8$ ppm (C-5'') et $\delta_C = 65.1$ ppm (C-6'') confirment la présence d'un seul ose, le glucose [9].

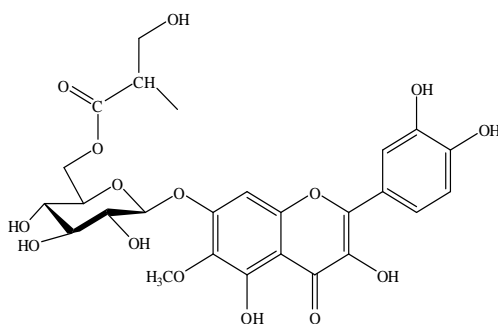
Concernant la nature et la position de l'ose substituant la génine, la comparaison des déplacements chimiques (en RMN du ¹H et du ¹³C) et de la constante de couplage de la fonction hémiacétalique avec les données recueillies dans la littérature tend à indiquer qu'il s'agit d'un glucose branché sur la fonction hydroxyle en 7 de la génine. Ceci est confirmé par l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (Spectre b.6) qui montre la corrélation du carbone 7 ($\delta_C = 157.6$ ppm) avec le proton H-1'' ($\delta_H = 5.10$ ppm). De plus, le

signal du méthoxyle à $\delta_H = 3.88$ ppm est corrélé avec le signal C-6 à $\delta_C = 133.5$ ppm de l'aglycone, indiquant que le groupement méthoxyle est attaché à la position C-6 lors de l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC.

La présence d'un signal d'un deuxième méthyle à $\delta_H = 1.04$ ppm qui corrèle avec le signal d'une fonction CH qui apparaît $\delta_C = 43.8$ ppm, avec une fonction cétonique qui apparaît à $\delta_C = 176.5$ ppm et avec une fonction CH_2OH qui apparaît à $\delta_C = 65.2$ ppm ceci indique la présence d'un groupement propanoyl branché en 6'' du glucose (Spectre b.6) à cause des taches de corrélations entre le carbonyle et les deux protons H-6''a et H-6''b

La structure du composé 21 B 0109-21 à 23 a donc pu être établie comme étant :

6-méthoxy-7-O- β -[6-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucosyl]-quercétine : ce produit est nouveau, isolé et rapporté pour la première fois d'une source végétale.

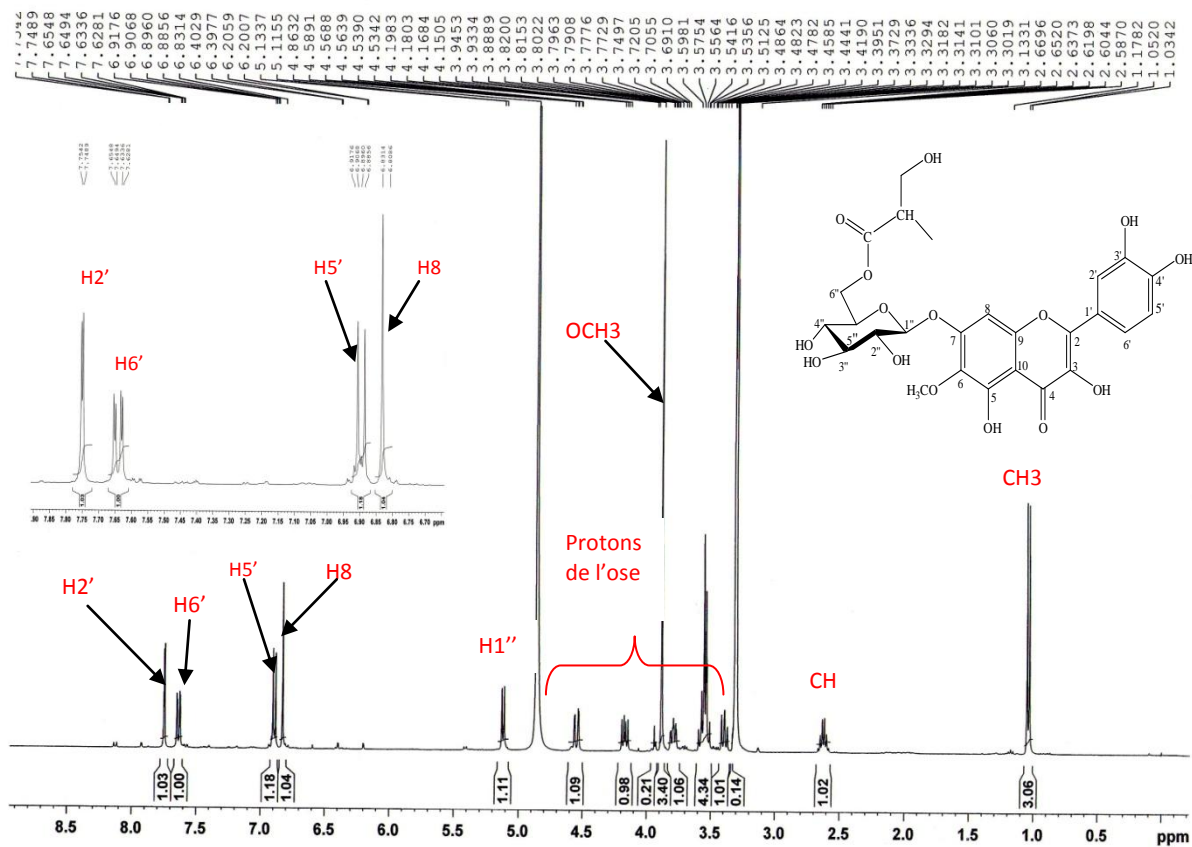


6-méthoxy-7-O- β -[6-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucosyl]-quercétine

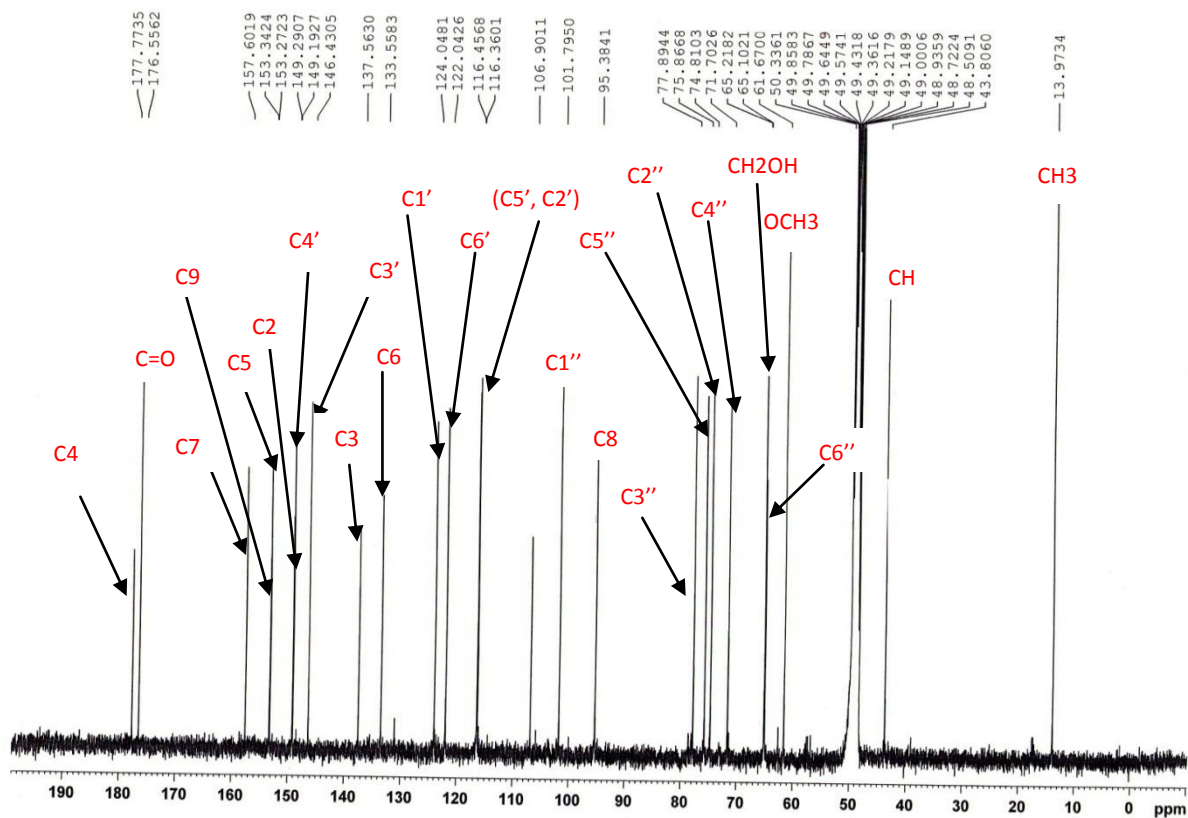
Les données de RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentées dans le tableau III.5

Tableau III.5 : RMN du ^1H et du ^{13}C (400 MHz, δ , J , en Hz ; 100 MHz, δ) du composé **21B0109-21à2**

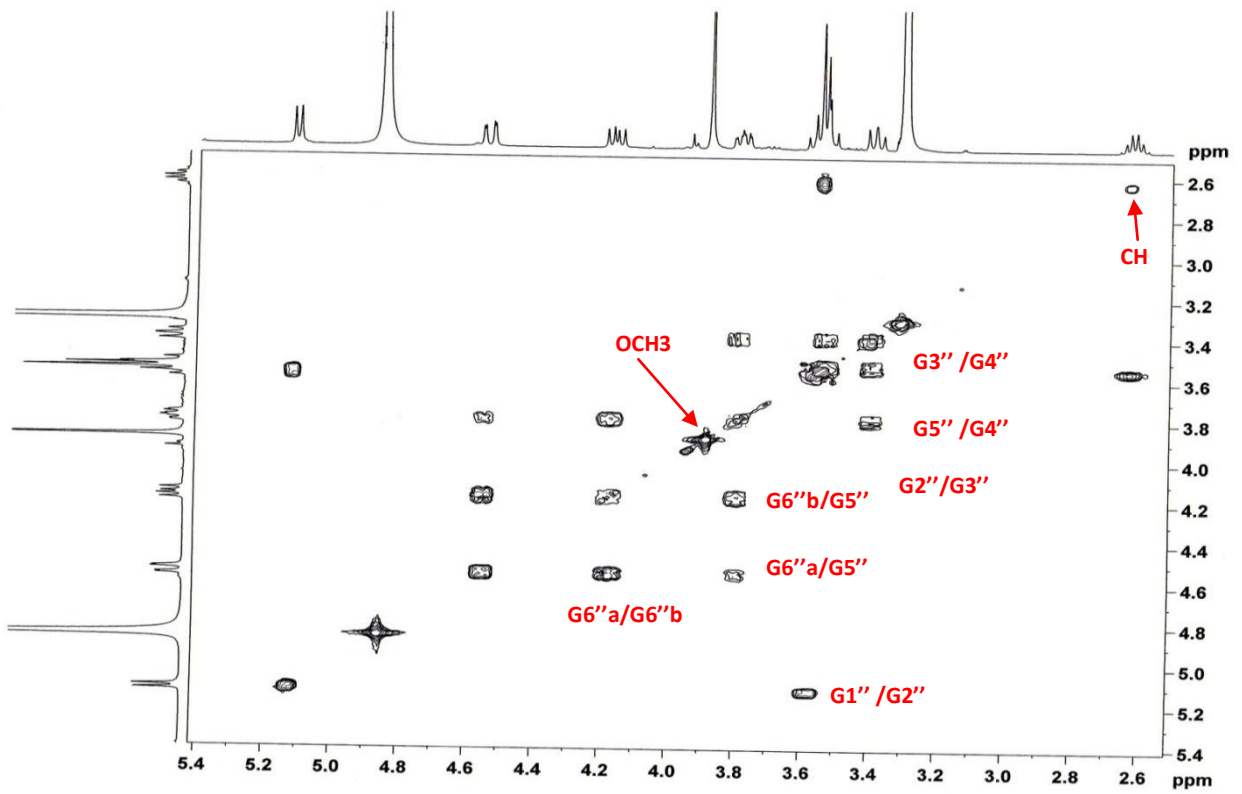
Génine	Composé 21B0109-21à23	
	^1H	^{13}C
	δ (ppm)	
2	-	149.2
3	-	137.5
4	-	177.7
5	-	153.2
6	-	133,5
7	-	157.6
8	6.84 <i>s</i> (1H)	95.3
9	-	153.3
10	-	106.9
1'	-	124.0
2'	7.75 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz, 1H)	116.4
3'	-	146.4
4'	-	149.1
5'	6.89 <i>d</i> ($J= 8.5$ Hz, 1H)	116.6
6'	7.64 <i>dd</i> ($J= 8.5$ Hz, $J= 2.2$ Hz, 1H)	122.0
OCH ₃	3.88 <i>s</i> (3H)	61.6
Glucose		
1''	5.10 <i>d</i> ($J= 7.3$ Hz, 1H)	101.7
2''	3.57 <i>t</i> ($J= 9.1$ Hz, 1H)	74.8
3''	3.53 <i>t</i> ($J= 9,2$ Hz, 1H)	77.8
4''	3.4 <i>t</i> ($J= 9,6$ Hz, 1H)	71.7
5''	3.8 <i>ddd</i> ($J= 9,2; 7,2; 1,9$ Hz, 1H)	75.8
6''	a: 4.17 <i>dd</i> ($J= 12.0$ Hz ; $J= 7.2$ Hz, 1H) b: 4.55 <i>dd</i> ($J= 12.0$ Hz ; $J= 2.0$ Hz, 1H)	65.1
Propanoyl		
CH	2.63 Sextuplet ($J= 7.0$ Hz , 1H)	43.8
CH ₃	1.04 <i>d</i> ($J= 7.1$ Hz, 3H)	13.9
CH ₂ OH	3,55 <i>d</i> ($J= 5.9$ Hz, 2H)	65.2
C=O	-	176.5



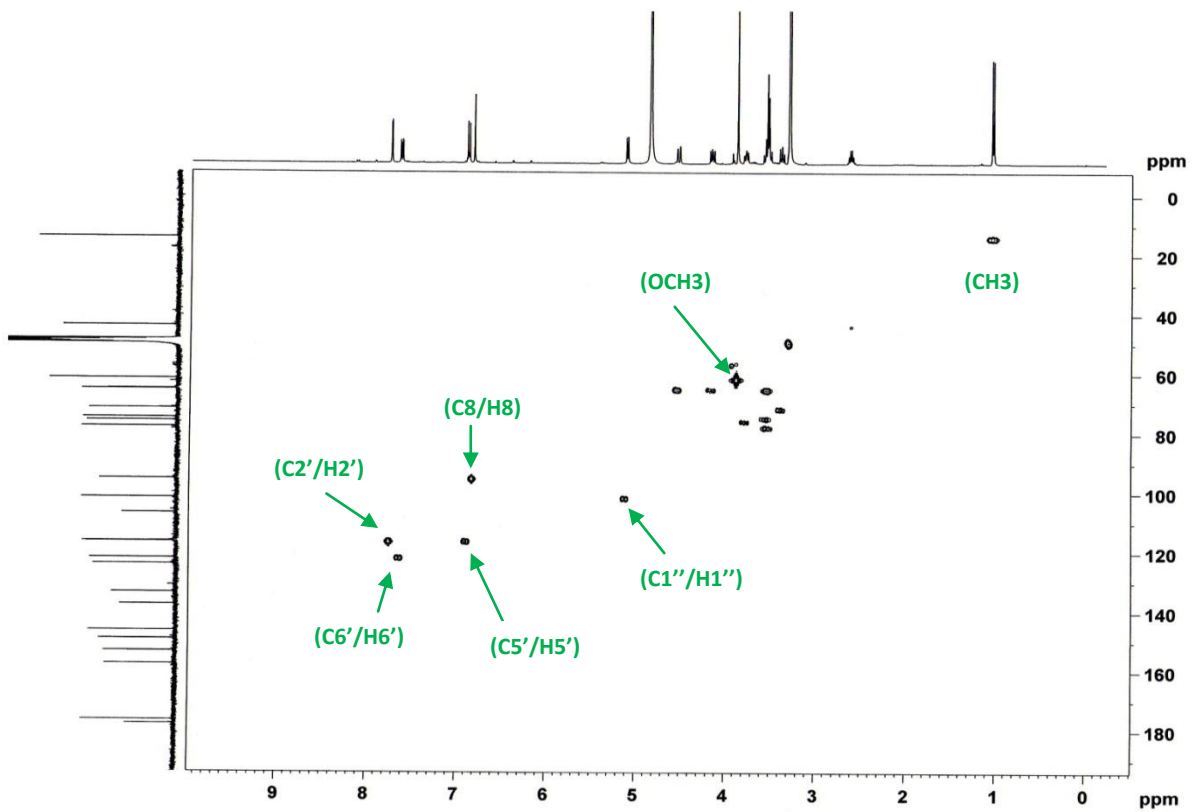
Spectre b.1 : Spectre RMN ^1H du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD_3OD).



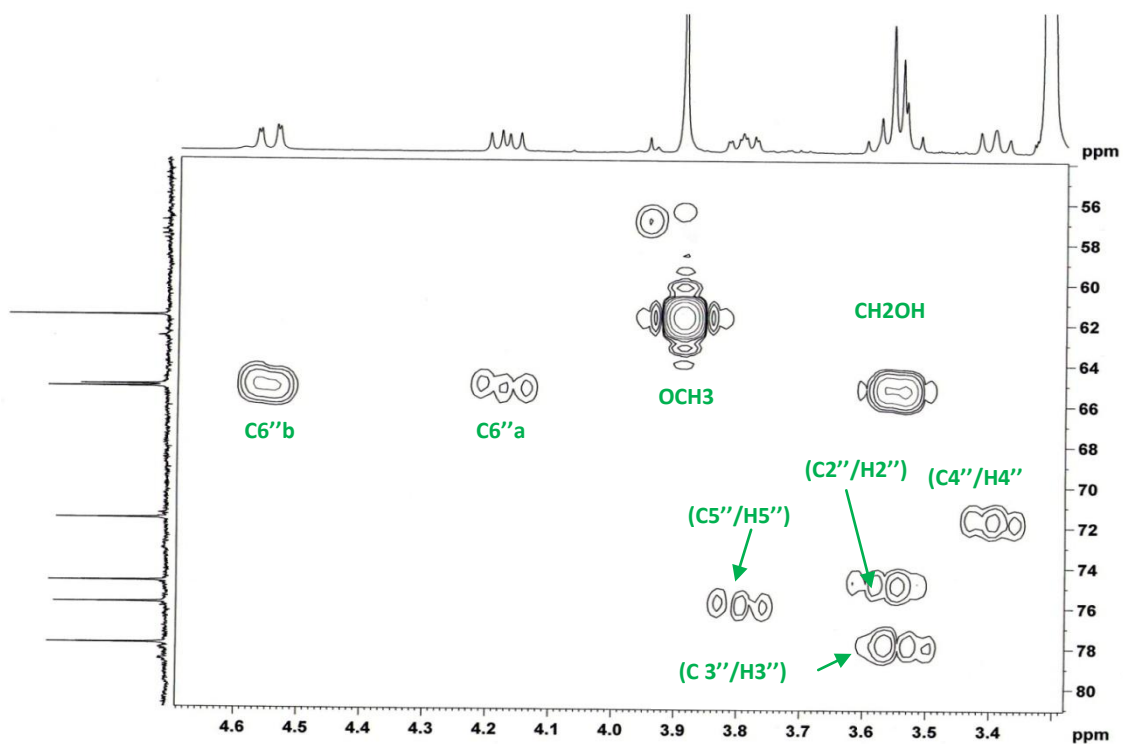
Spectre b.2 : Spectre RMN ^{13}C du composé 21B0109-21à23 (100 MHz, CD_3OD).



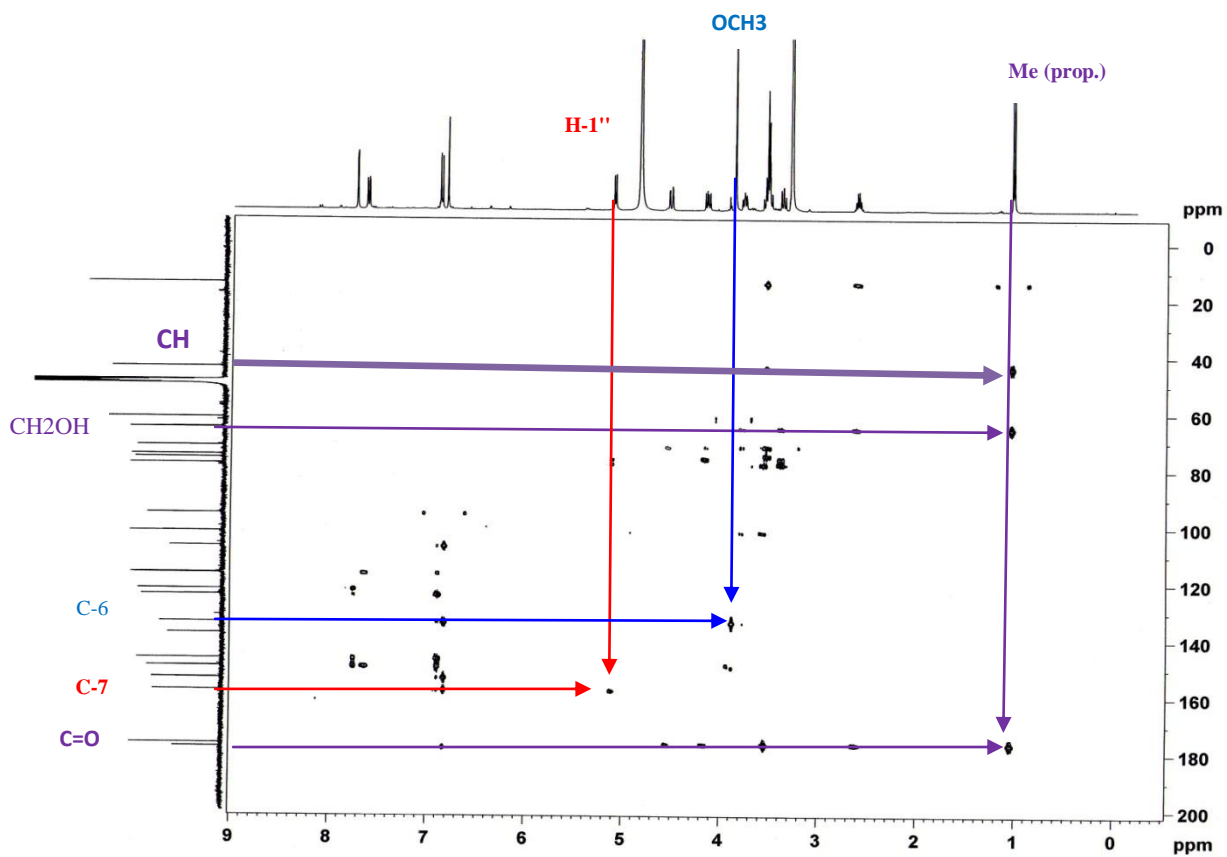
Spectre b.3 : Spectre Cosy étalé (2.6 à 5.4 ppm) du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre b.4 : Spectre HMQC du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre b.5 : Spectre HMBC étalé (56 à 80 ppm) du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre b.6 : Spectre HMBC du composé 21B0109-21à23 (400 MHz, CD₃OD).

c.Elucidation de la structure du composé 130109-10

•Analyses physico-chimiques

- Le composé 130109-10 se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : Violette, $R_f = 0,42$ dans le système (Acétate d'éthyle / acide acétique/ acide formique/ H₂O : 80 :5 :5 :10)

•Analyses spectroscopiques

Les signaux présents sur le spectre de RMN-¹H du composé 130109-10 enregistré dans le méthanol (Spectre N°c.1) dans la région de protons aromatiques sont en faveur d'un squelette de type quercétine. En outre, nous observons les signaux de deux protons anomériques à $\delta_H = 4.51$ ppm et $\delta_H = 5.10$ ppm indiquant la présence de deux sucres.

Cette génine flavonique diglycosylée montre un système ABX, les signaux $\delta_H = 7.66$ ppm (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), $\delta_H = 7.63$ ppm (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H) et $\delta_H = 6.87$ ppm (d, $J = 8.4$ Hz, 1H) correspondent respectivement avec les protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B.

La RMN ¹H montre aussi deux signaux à $\delta_H = 6.21$ ppm (d, $J = 2.1$ Hz, 1H) et à $\delta_H = 6.40$ ppm (d, $J = 2.1$ Hz, 1H) qui correspondent respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A de flavonoïde.

Dans le spectre de RMN ¹H, on observe deux signaux correspondant à des protons anomériques à $\delta_H = 4.51$ ppm (d, $J = 1.5$ Hz, 1H) et $\delta_H = 5.10$ ppm (d, $J = 7.5$ Hz, 1H) avec des constantes de couplage caractéristiques de α et β - configuration, respectivement [9-11].

Le rhamnose est identifié par son proton anomérique qui résonne à $\delta_H = 4.51$ ppm avec une constante de couplage faible et le doublet du méthyle situé à $\delta_H = 1.12$ ppm (3H, $J = 6.2$ Hz). Les autres protons des sucres sont situés entre 3.26 ppm et 3.80 ppm.

Le spectre du ¹³C montre bien la présence d'un dioside dont la majorité de ses carbones résonne entre 67 ppm et 76 ppm. Le spectre c.4 permet l'observation des signaux à $\delta_C = 104.7$ ppm et $\delta_C = 102.4$ ppm correspondant aux protons anomériques de glucose et rhamnose respectivement [9]. Le carbone C-6''' à $\delta_C = 17.9$ ppm est caractéristique du méthyle du rhamnose.

Le spectre du ¹³C (spectre N°c.2) montre 27 signaux dénombrés et qui ont permis de suggérer la formule brute C₂₇H₃₀O₁₆.

Les techniques HSQC, COSY et HMBC permettent l'attribution de tous les signaux de RMN du ¹H et du ¹³C pour le produit naturel 130109-10.

L'expérience HMBC (Spectre N°c.7) permet de déterminer les positions respectives des deux constituants de la molécule. Le signal à $\delta_H = 5.10$ ppm (H-1'') du proton anomérique du

glucose est corrélé avec le signal à $\delta_C = 135.7$ ppm (C-3) de l'aglycone, indique que la position C-3 de l'aglycone est glycosylée.

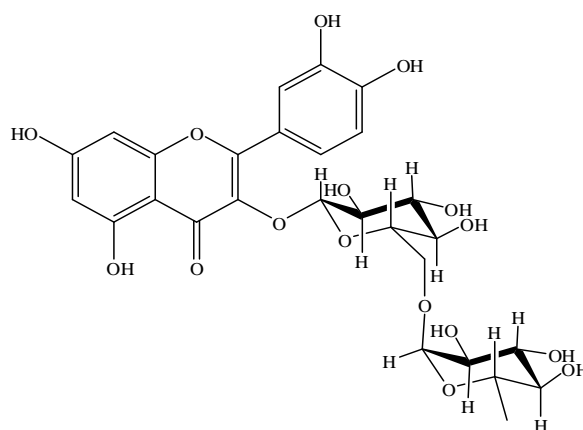
Le signal à $\delta_H = 68.7$ ppm de C-6'' et avec comparaison avec le glucose indique que C-6'' est glycosylé. Le signal $\delta_H = 4.51$ ppm (H-1''') montre une corrélation avec le signal $\delta_H = 68.7$ ppm (C-6'') du glucose, indiquant que le rhamnose est attaché à C-6'' du glucose par son carbone C-1'''.

Ainsi, ces corrélations HMBC observées ont permis de montrer que les deux sucres sont liés en (C1-C6) et d'identifier le diglycoside comme étant du rutinose (rhamnopyranosyl-(α 1-6)-glucopyranoside) et ont attesté que le rutinose est fixé sur la génine quercétine en position 3.

Le composé 130109-10 a donc été identifié comme étant la quercétine-3-O- β -rutinoside, aussi appelée rutine [12]. Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans *Ruta graveolens* (d'où son nom) et elle est présente dans plus de trente familles de plantes principalement dicotylédones.

Elle est également très connue pour ses nombreuses propriétés biologiques notamment antioedémateuse, anti-inflammatoire, anti-thrombotiques, anti-hypotensive, spasmolytique et antihémorragique [13].

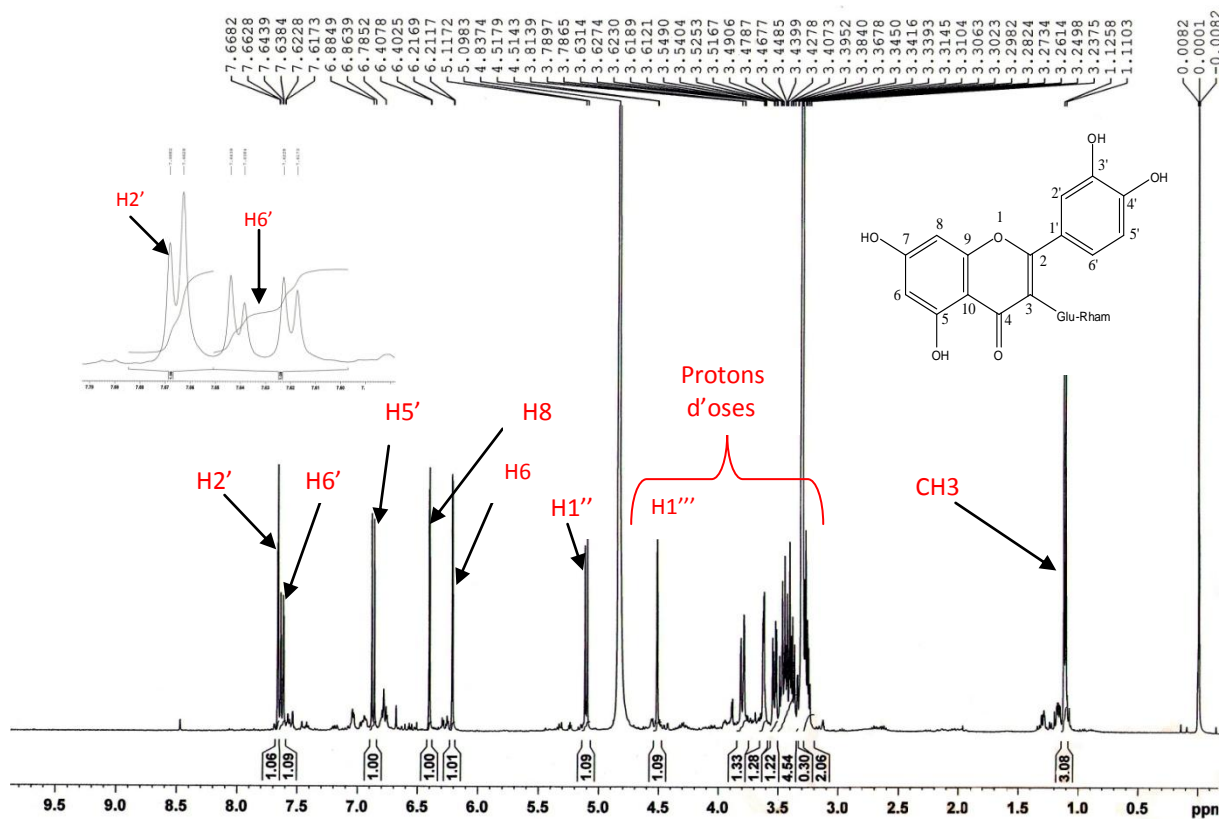
Les attributions de tous les signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentées dans le tableau III.6.



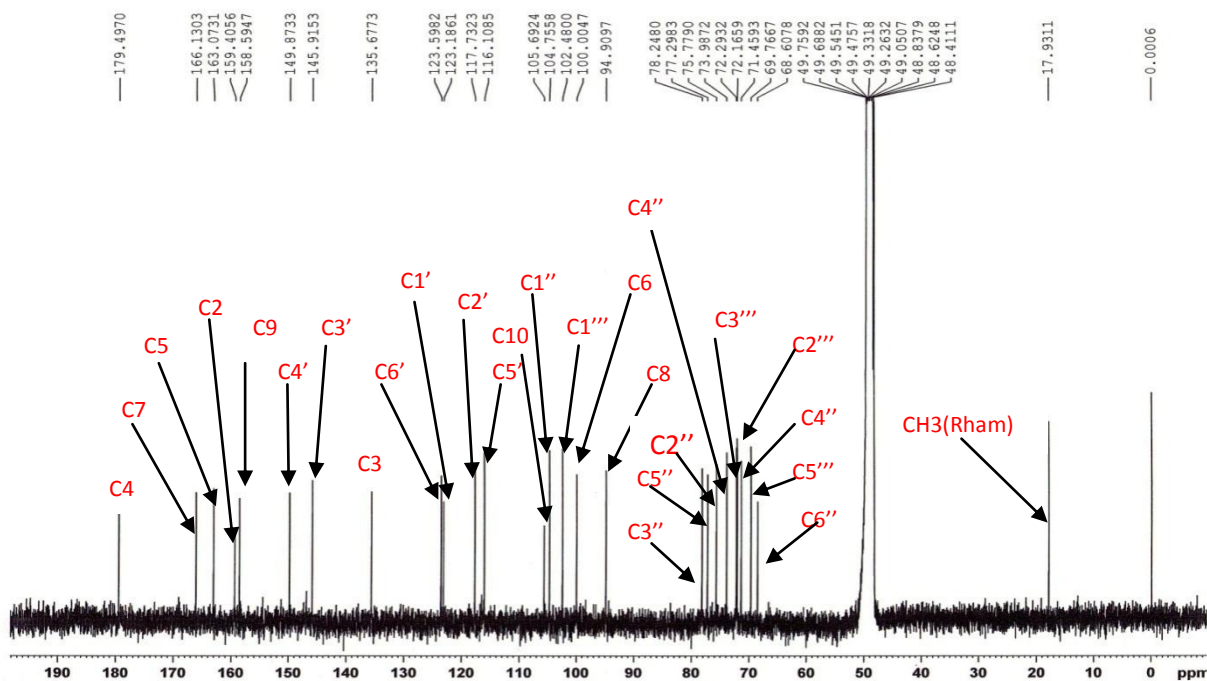
3-O- β -rutinoside-quercétine

Tableau III.6 : RMN du ^1H et du ^{13}C (400 MHz, δ , J , en Hz ; 100 MHz, δ) du composé 130109-10 dans le CD_3OD .

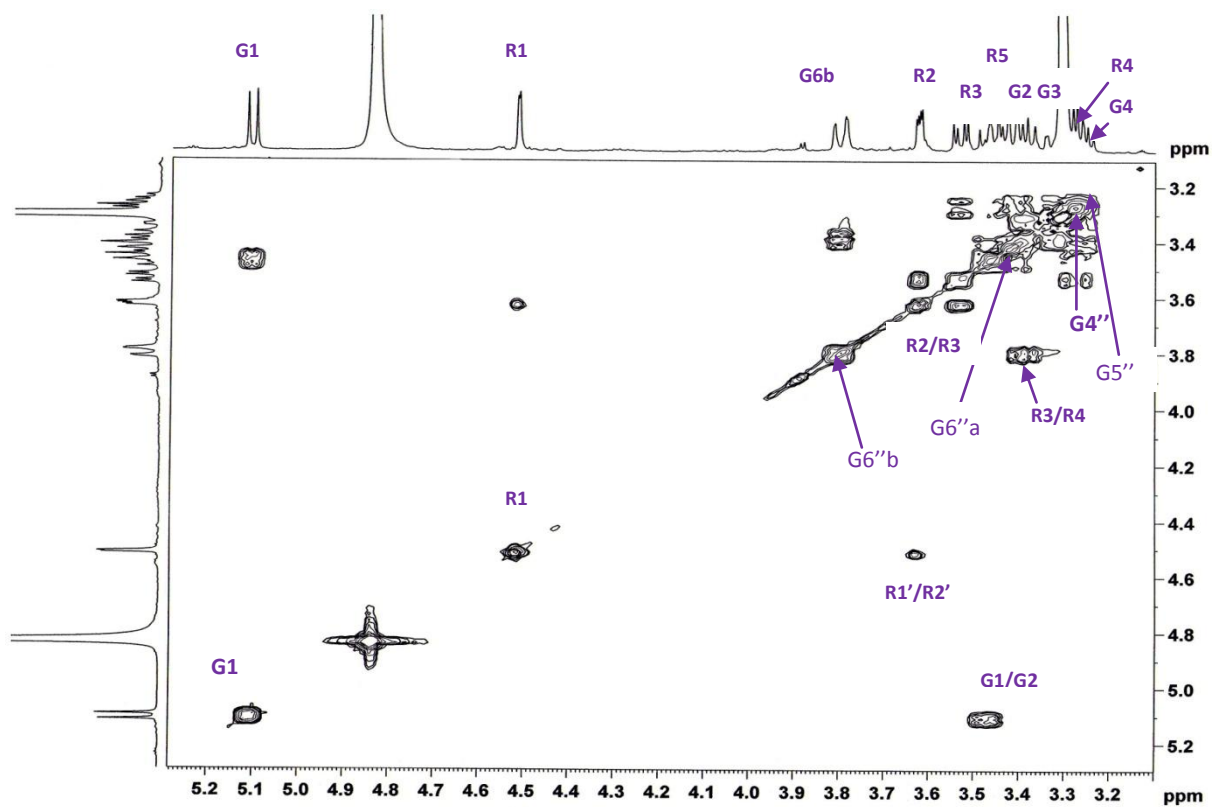
Génine	Composé 130109-10	
	^1H	^{13}C
	δ (ppm)	
2	-	159.4
3	-	135.7
4	-	179.5
5	-	163.1
6	6.21 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz, 1H)	100.0
7	-	166.1
8	6.40 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz, 1H)	94.9
9	-	158.6
10	-	105.7
1'	-	123.1
2'	7.66 <i>d</i> ($J= 2.2$ Hz, 1H)	117.7
3'	-	145.9
4'	-	149.9
5'	6.87 <i>d</i> ($J= 8.4$ Hz, 1H)	116.1
6'	7.63 <i>dd</i> ($J= 8.4$ Hz, $J= 2.2$ Hz, 1H)	123.6
glucose		
1''	5.10 <i>d</i> ($J= 7.5$ Hz, 1H)	104.7
2''	3.47 <i>t</i> ($J= 9.2$ Hz, 1H)	75.8
3''	3.41 <i>t</i> ($J= 9.3$ Hz, 1H)	78.2
4''	3.26 <i>t</i> ($J= 9.54$ Hz, 1H)	71.4
5''	3.30 <i>m</i>	77.3
6''	a: 3.38 <i>dd</i> ($J= 10.9$ Hz, $J= 6.5$ Hz, 1H)	68.7
	b: 3.80 <i>dd</i> ($J= 10.9$ Hz, $J= 1.3$ Hz, 1H)	
rhamnose		
1'''	4.51 <i>d</i> ($J= 1.4$ Hz, 1H)	102.4
2'''	3.62 <i>dd</i> ($J= 3.40$ Hz, $J= 1.6$ Hz, 1H)	72.1
3'''	3.53 <i>dd</i> ($J= 9.5$ Hz, $J= 3.4$ Hz, 1H)	72.3
4'''	3.27 <i>t</i> ($J= 9.4$ Hz, 1H)	73.9
5'''	3.45 <i>m</i>	69.7
6'''	1.12 <i>d</i> ($J= 6.2$ Hz, 3H)	17.9
$\text{CH}_3(\text{Rha})$		



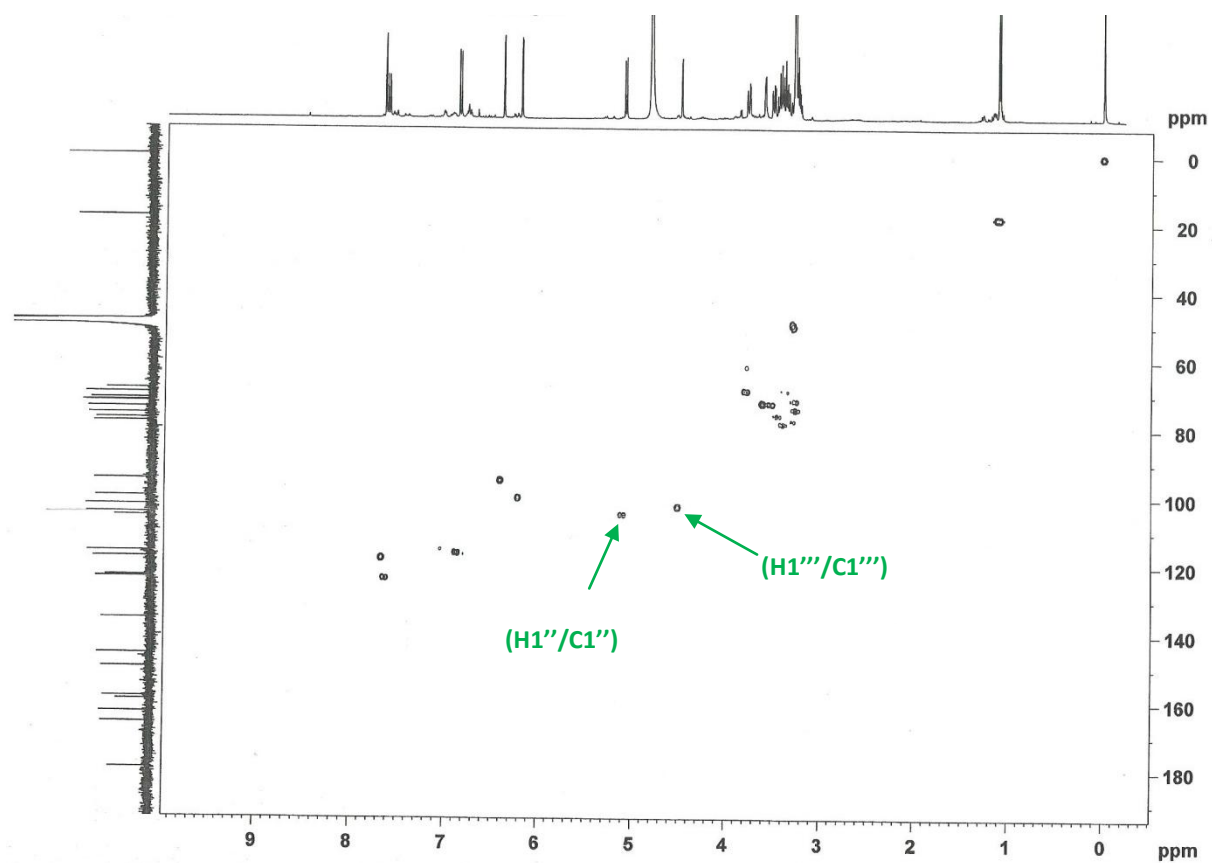
Spectre c.1 : Spectre RMN ^1H du composé 130109-10 (400 MHz, CD_3OD).



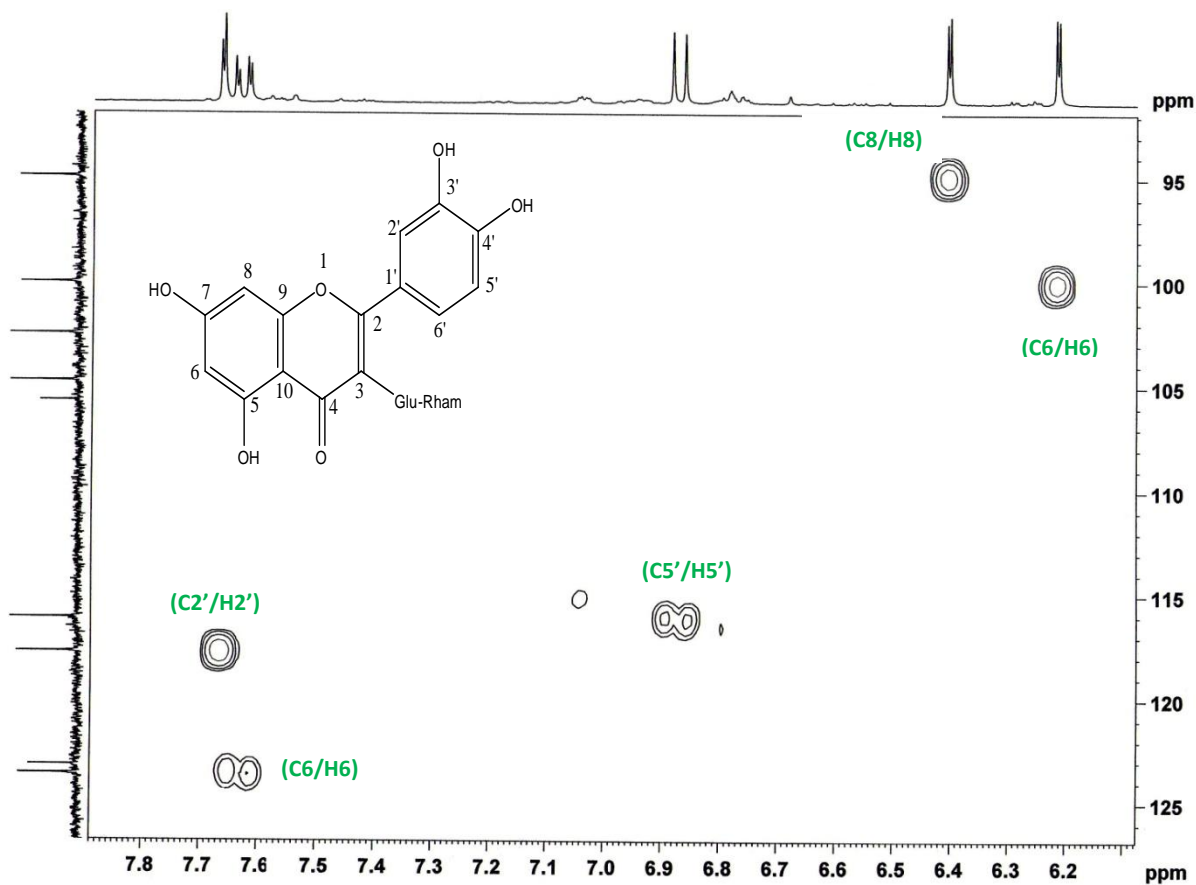
Spectre c.2 : Spectre RMN ^{13}C du composé 130109-10 (100 MHz, CD_3OD).



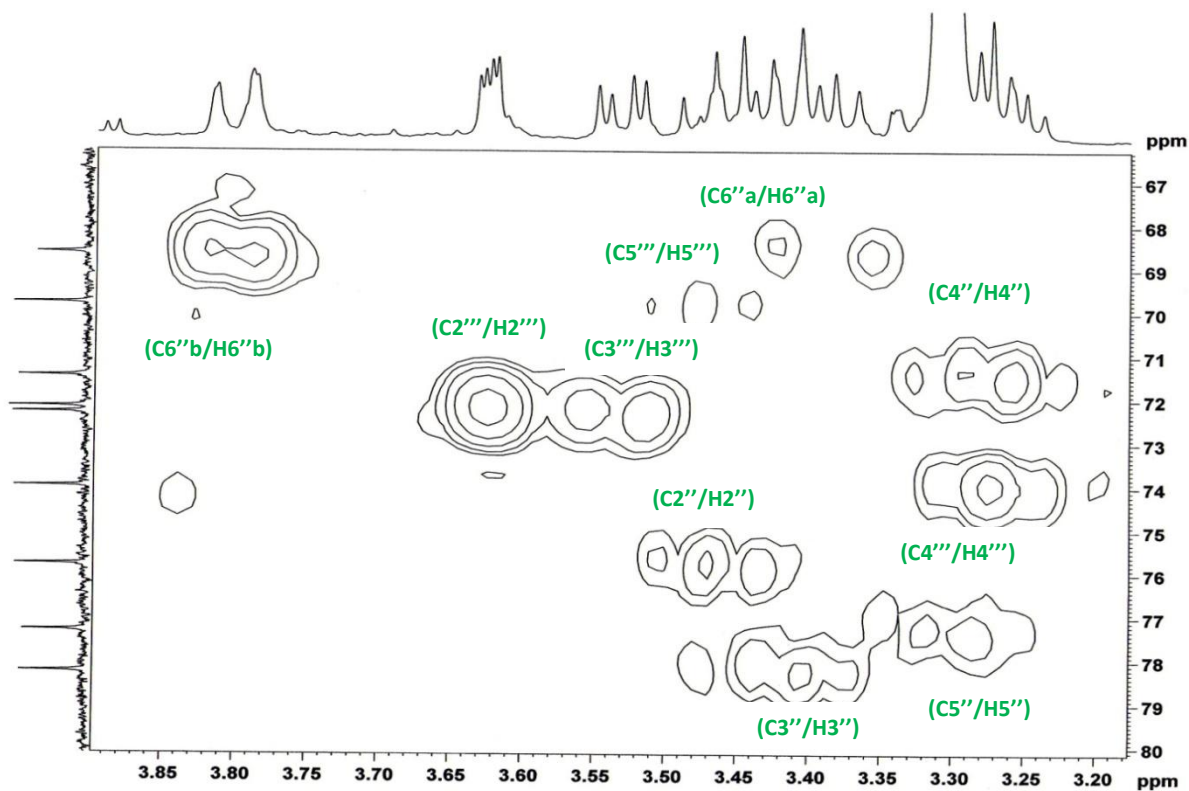
Spectre c.3 : Spectre Cosy étalé (3.2 à 5.2 ppm) du composé 130109-10 (400 MHz, CD₃OD).



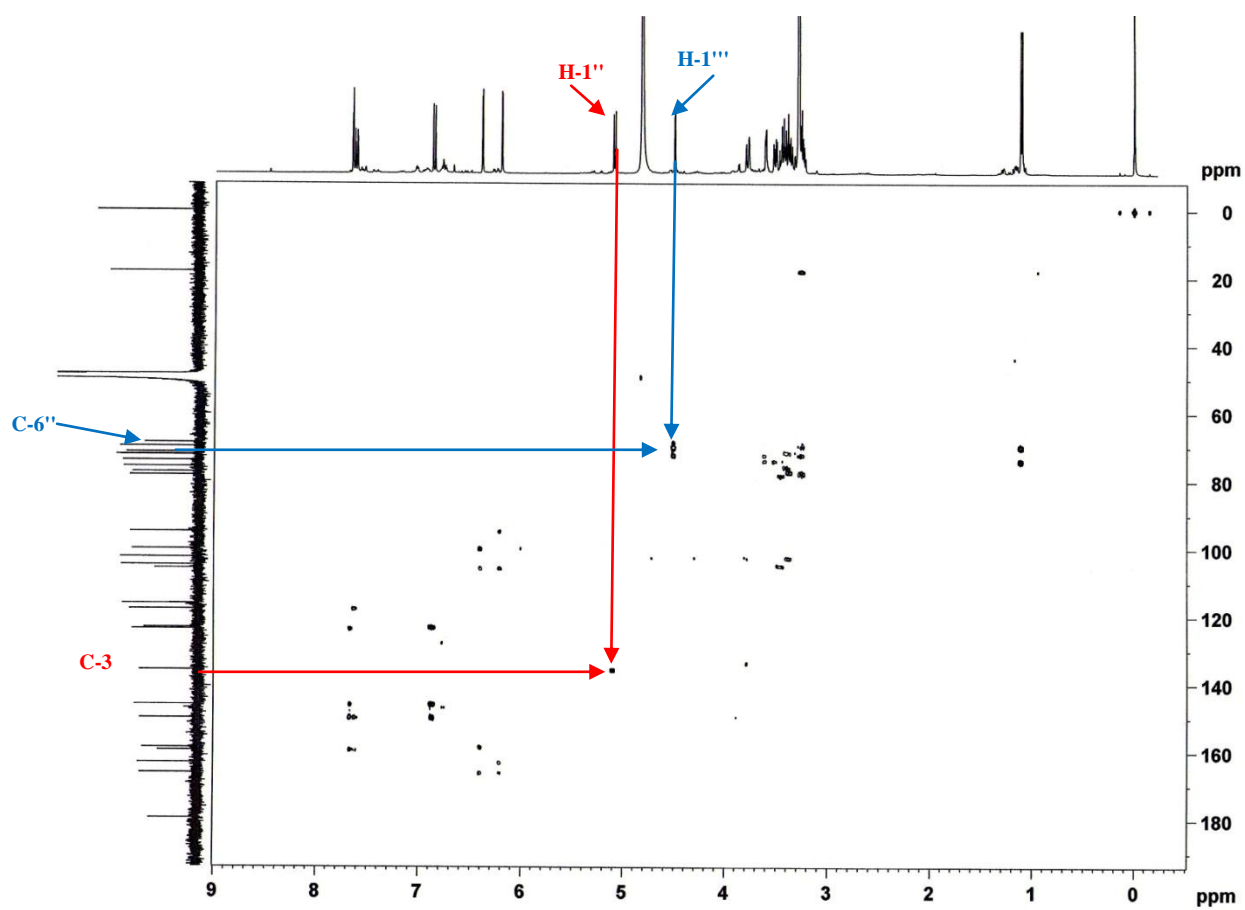
Spectre c.4 : Spectre HMQC du composé 130109-10 (400 MHz, CD₃OD)



Spectre c.5 : Spectre HMQC étalé (95 à 125 ppm) du composé 130109-10 (400 MHz, CD₃OD)



Spectre c.6 : Spectre HMQC étalé (95 à 125 ppm) du composé 130109-10 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre c.7: Spectre HMBC du composé 130109-10 (400 MHz, CD_3OD).

d. Elucidation de la structure du composé 90109-12x15

•Analyses physico-chimiques

- Le composé 90109-12x15 se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : Jaune.
- $R_f = 0.44$ dans le système (Acétate d'éthyle/ acide acétique/ acide formique/ H₂O : 80 ml/ 5ml/ 5ml/ 10ml).

•Analyses spectroscopiques

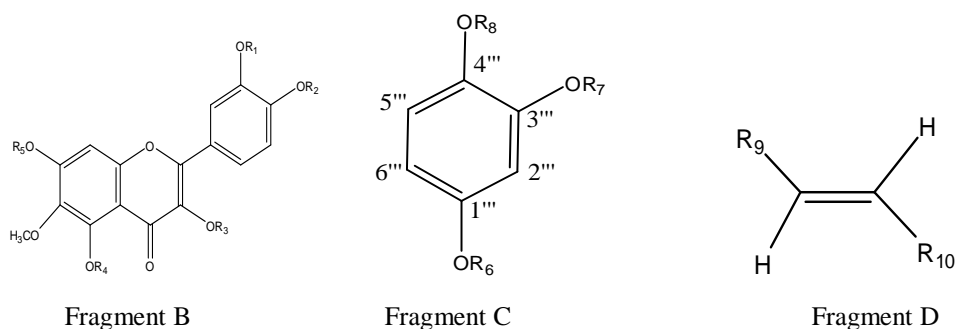
Dans le spectre RMN du proton enregistré dans le CD₃OD du composé 90109-12.15 (Spectres d.1 et d.2), on observe de nombreux pics entre $\delta_H = 6.0$ ppm et $\delta_H = 7.8$ ppm, ce qui laisse présager la présence de plusieurs noyaux aromatiques dans la molécule. A $\delta_H = 5.13$ ppm (d, $J = 7.4$ Hz), on remarque la présence d'un seul signal susceptible de correspondre à un proton anomérique d'un seul ose, ce qui est confirmé par la présence dans le spectre de RMN du ¹³C (Spectres d.3 et d.4) de 5 signaux ($\delta_C = 74.7$ ppm, $\delta_C = 77.8$ ppm, $\delta_C = 72.1$ ppm, $\delta_C = 75.5$ ppm, $\delta_C = 64.7$ ppm) caractéristiques des carbones d'un sucre (Fragment A).

Le spectre de RMN du proton étalé (Spectre d.2) présente des déplacements chimiques compatibles avec ceux observés pour une quercétine substituée (Fragment B). D'une part: on observe un système ABX à $\delta_H = 7.68$ ppm (d, $J = 2.1$ Hz, 1H) et $\delta_H = 6.81$ ppm (d, $J = 8.5$ Hz) et $\delta_H = 7.55$ ppm (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.5$ Hz, 1H) attribués respectivement aux protons H-2', H-5' et H-6' du noyau B, témoignant ainsi une substitution en 3' et 4'.

Un singulet à $\delta_H = 6.60$ ppm correspondant au proton H-8 du cycle A. La présence d'un méthoxyle est caractérisée par l'apparition d'un singulet à $\delta_H = 3.90$ ppm cela est confirmé par la RMN du ¹³C (Spectres d.3 et d.4) par l'apparition d'un carbone à $\delta_C = 61.7$ ppm. D'autre part on observe un singulet (2H) à $\delta_H = 6.51$ ppm correspondant aux protons (H-2'''- H-6''') d'un noyau aromatique paradisbstitué (fragment C).

On observe également deux doublets : à $\delta_H = 6.12$ ppm, H α (d, $J = 15.8$ Hz) et à $\delta_H = 7.37$ ppm, H β (d, $J = 15.8$ Hz) indiquant la présence de deux protons vicinaux d'une double liaison de configuration *trans*. Leurs déplacements chimiques déblindés pourraient être dûs à une conjugaison de la double liaison avec un carbonyle (Fragment D).

Fragment A : L'ose



A partir des structures partielles déterminées par une analyse du spectre RMN ^1H et du carbone ^{13}C , on peut déduire les attributions du carbone à partir des spectres Cosy (^1H - ^1H), (Spectre d.5), HSQC étalés (Spectres d.6 et d.7) et HMBC étalé (Spectre d.8).

Les spectres RMN ^1H d.1 et d.2, permettent d'attribuer les signaux à $\delta_{\text{H}} = 3.85$ ppm (*ddd*, $J = 2.4$ Hz, $J = 9.0$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 4.32$ ppm (*dd*, $J = 7.3$ Hz et $J = 11.9$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 4.62$ ppm (*dd*, $J = 2.4$ Hz et $J = 11.9$ Hz) aux protons H-5'', H-6_a'' et H-6_b'' d'un sucre acétylé en 6. Deux multiplets qui apparaissent à $\delta_{\text{H}} = 3.58$ ppm et un signal à $\delta_{\text{H}} = 3.45$ ppm (*t*, $J = 9.0$ Hz) (Spectre d.7 HMQC étalé) ont été attribués respectivement aux protons H-2'', H-3'' et H-4'' d'un glucose conformément à ceux de la littérature [9].

L'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC étalé (Spectre d.8) montre un signal du méthoxyle à $\delta_{\text{H}} = 3.9$ ppm est corrélé avec le signal C-6 à $\delta_{\text{C}} = 133.4$ ppm de l'aglycone, indiquant que le groupement méthoxyle est attaché à la position C-6.

L'HMBC permet aussi d'établir les liaisons entre les différents fragments A, B, C, D déterminés. En effet le spectre HMBC du composé 90109-12x15 montre d'une part une tache de corrélation correspondant au doublet à $\delta_{\text{H}} = 7.37$ ppm attribué à H- β et aux signaux à $\delta_{\text{C}} = 115.6$ ppm et à $\delta_{\text{C}} = 122.3$ ppm attribués aux carbones C-2''' et C-6''' et d'autre part une tache de corrélation correspondant au doublet à $\delta_{\text{H}} = 6.12$ ppm attribué à H- α et au signal à $\delta_{\text{C}} = 127.4$ ppm attribué au carbone quaternaire C-1''', cela permet de lier le fragment C au fragment D.

D'autre part, on observe un doublet dédoublé mal résolu à 6,52 ppm (*dd*, $J = 8,0$; $J = 1,4$ Hz, 1H) attribué à H-6''' qui s'interpénètrent avec un autre doublet apparaissant à 6,50 ppm (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H) attribué à H5''' caractéristiques d'un noyau caféique, le proton H2''' apparait sous forme de singulet large à 6,70 ppm.

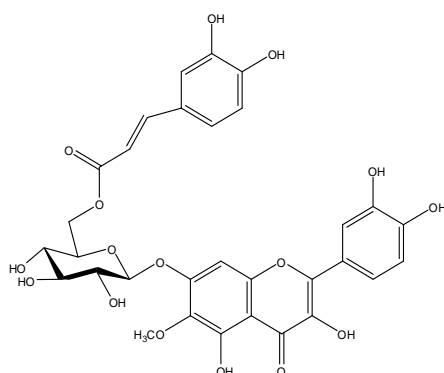
On peut aussi distinguer deux taches de corrélations correspondants aux protons α , β couplés au carbone quaternaire résonnant à un champ faible à $\delta_{\text{C}} = 169.1$ ppm, indiquant qu'il s'agit d'un carbone d'un carbonyle d'une fonction ester.

Le carbone en question est également corrélé aux protons résonnant à $\delta_{\text{H}}= 4.32$ ppm et $\delta_{\text{H}}= 4.62$ ppm correspondant aux protons H-6_a" et H-6_b" confirmant ainsi le carbone acétylé du glucose (Fragment A).

Finalement on peut déterminer la position de la jonction de ce fragment avec la quercétine à travers une tache de corrélation correspondant au proton anomérique couplé au carbone dont le signal apparait à $\delta_{\text{C}}= 157.3$ ppm indiquant une glycosylation en position 7.

L'absence d'autres signaux dans le spectre RMN ¹H permet d'identifier les positions 3''' et 4''' à des hydroxyles.

La structure du composé 90109-12.15 est donc établie comme étant 7-*O*-[6-*O*-caffeoyl]-glucosyl]-6-méthoxyquercétine.



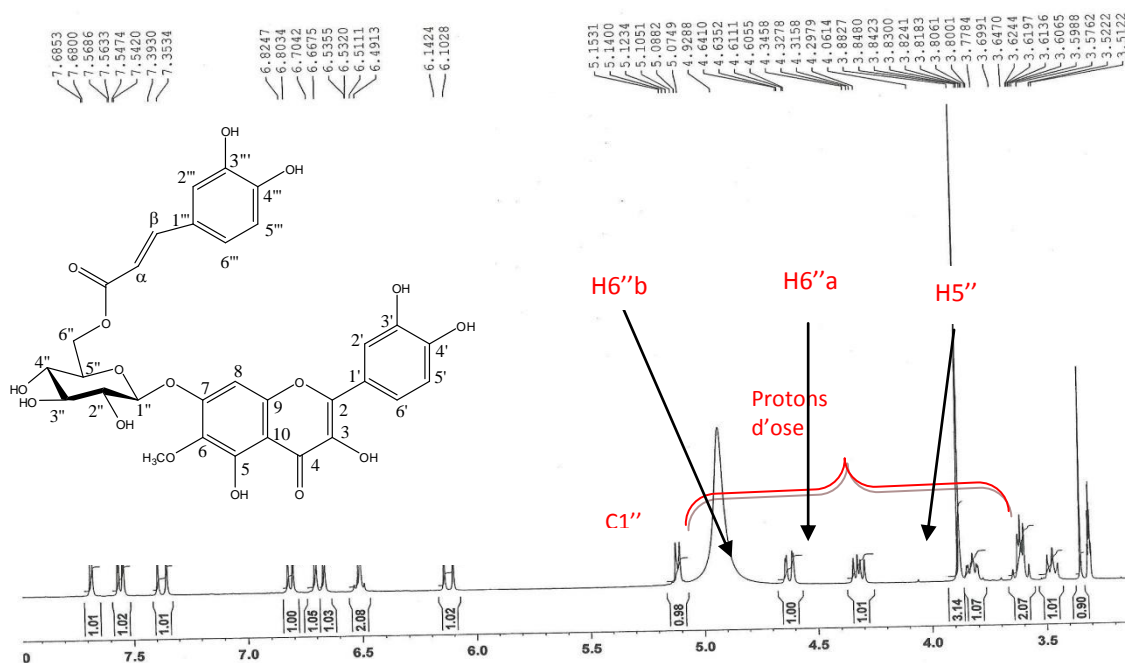
7-*O*-[6-*O*-caffeoyl]-glucosyl]-6-méthoxyquercétine.

Les déplacements chimiques observés en RMN du ¹H et du ¹³C sont présentés dans le tableau III.7.

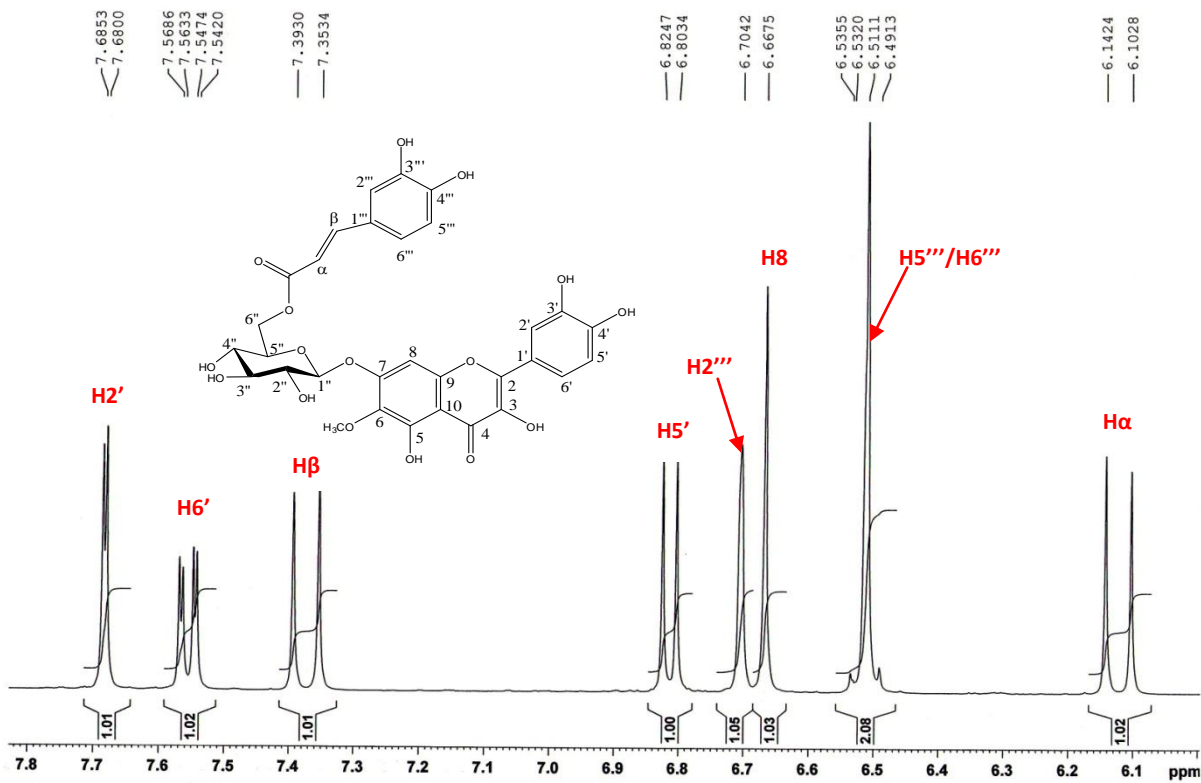
Tableau III.7 : RMN du ^1H et du ^{13}C (400 MHz, δ , J en Hz ; 100 MHz, δ) du composé 90109-12x15 dans le CD_3OD .

	Composé 90109-12x15	
	^1H	^{13}C
Génine	δ (ppm)	
2	-	148.9
3	-	137,3
4	-	177.3
5	-	152.9
6	-	133,4
7	-	157.3
8	6.66 (s)	95.2
9	-	153,1
10	-	106,7
1'	-	123.9
2'	7.68 <i>d</i> ($J= 2.1$ Hz, 1H)	116.3
3'	-	146.1
4'	-	148.8
5'	6.81 <i>d</i> ($J= 8.5$ Hz, 1H)	116.2
6'	7.55 <i>dd</i> ($J= 2.1$ Hz, $J= 8.5$ Hz, 1H)	122.0
OCH_3	3.9 s (3H)	61.7
Glucose		
1''	5.13 <i>d</i> ($J= 7.4$ Hz, 1H)	101.6
2''	3.58 <i>m</i>	74.7
3''	3.58 <i>m</i>	77.8
4''	3.45 <i>t</i> ($J= 9$ Hz, 1H)	72.1
5''	3.85 <i>td</i> ($J= 2.4$ Hz, $J= 9$ Hz, 1H)	75.5
6''	a : 4.32 <i>dd</i> ($J= 11.9$, $J= 7.3$ Hz, 1H) b : 4.62 <i>dd</i> ($J= 2.4$ Hz, $J= 11.9$ Hz, 1H)	64.7
Caffeoyl		
α	6.12 <i>d</i> ($J= 15.8$ Hz, 1H)	114.5
β	7.37 <i>d</i> ($J= 15.8$ Hz, 1H)	147.5
1'''	-	127.4
2'''	6.70 <i>s large</i> (1H)	115.6

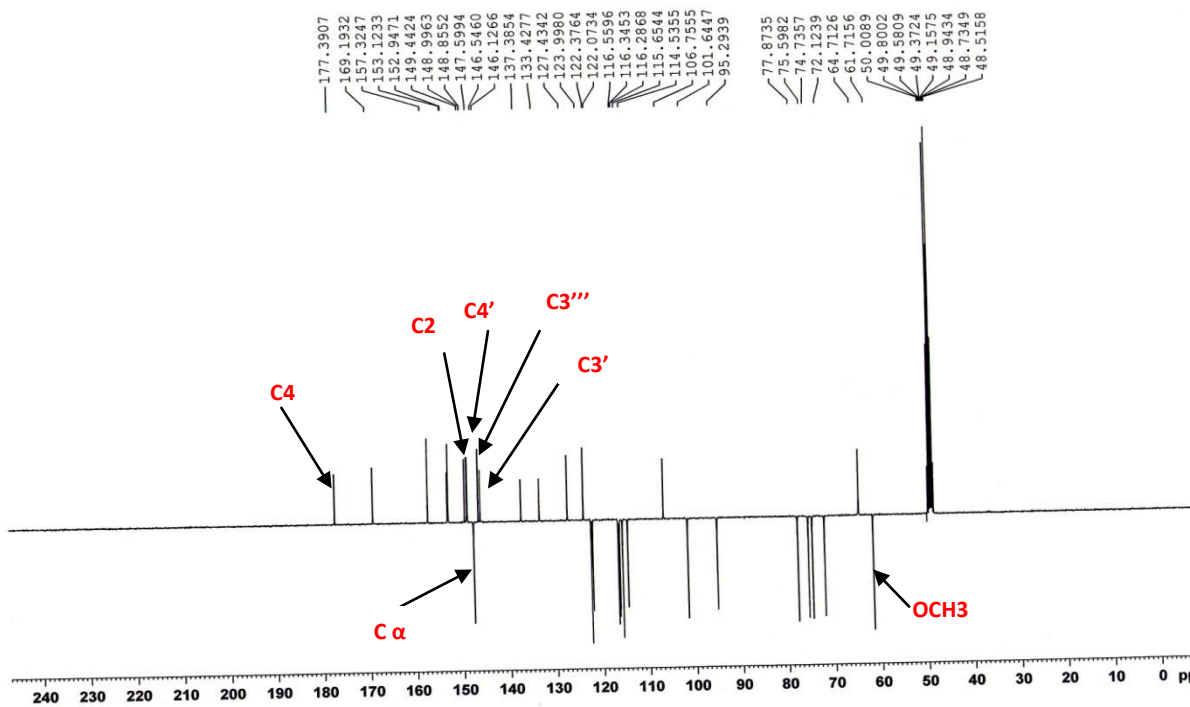
3'''	-	146.5
4'''	-	149.5
5'''	6,50 <i>d</i> ($J=8,0$ Hz, 1H)	116.5
6'''	6.52 <i>dd</i> ($J= 1,4, 8,0$ Hz) (1H)	122.3
CO	-	169.1



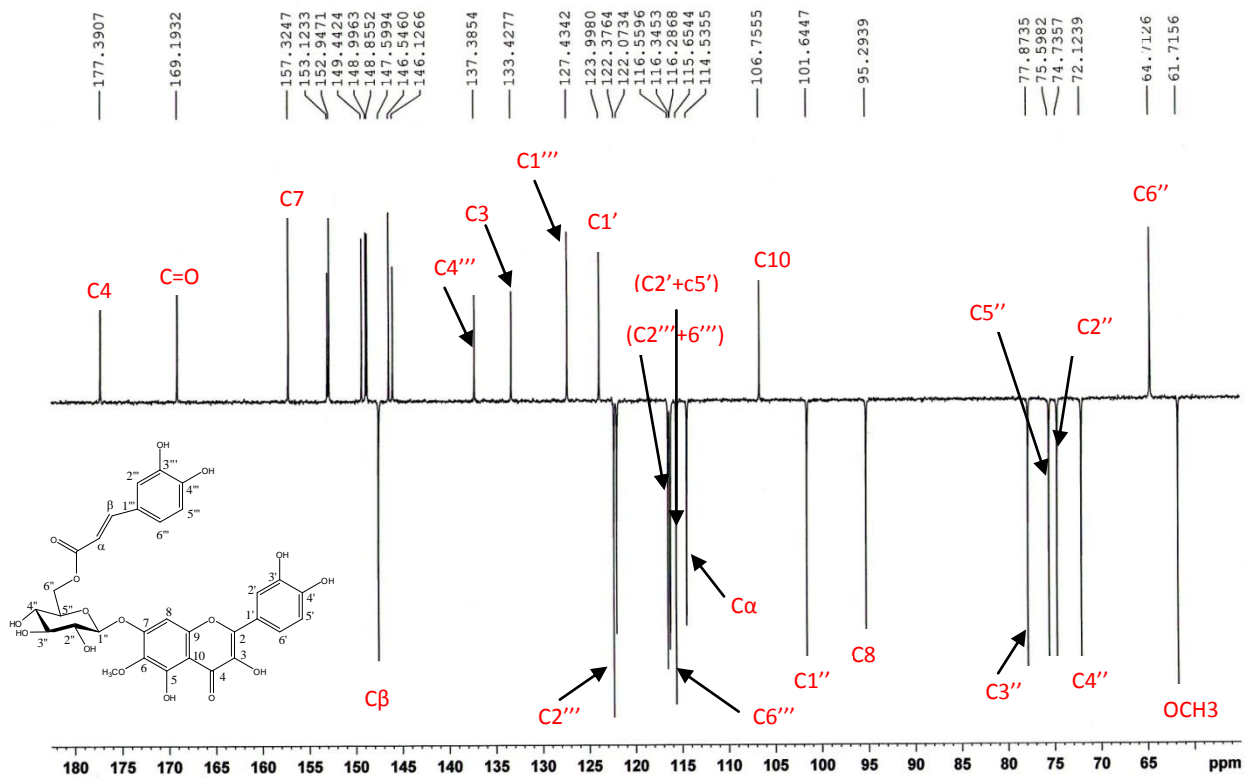
Spectre d.1 : Spectre RMN ^1H du composé 90109-12x15 (400 MHz, CD_3OD).



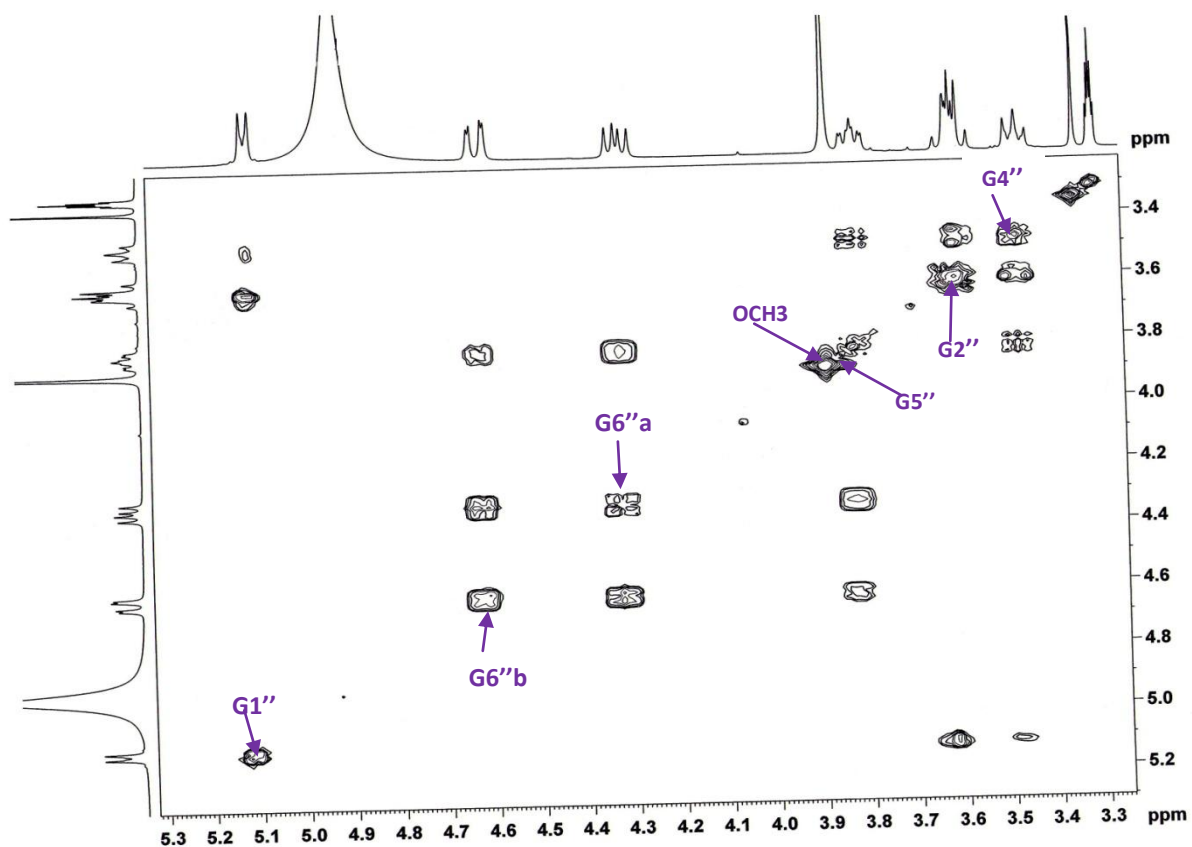
Spectre d.2 : Spectre RMN ^1H étalé (6.1 à 7.8 ppm) du composé 90109-12x15 (400 MHz, $\text{C}_3\text{D}_8\text{OD}$).



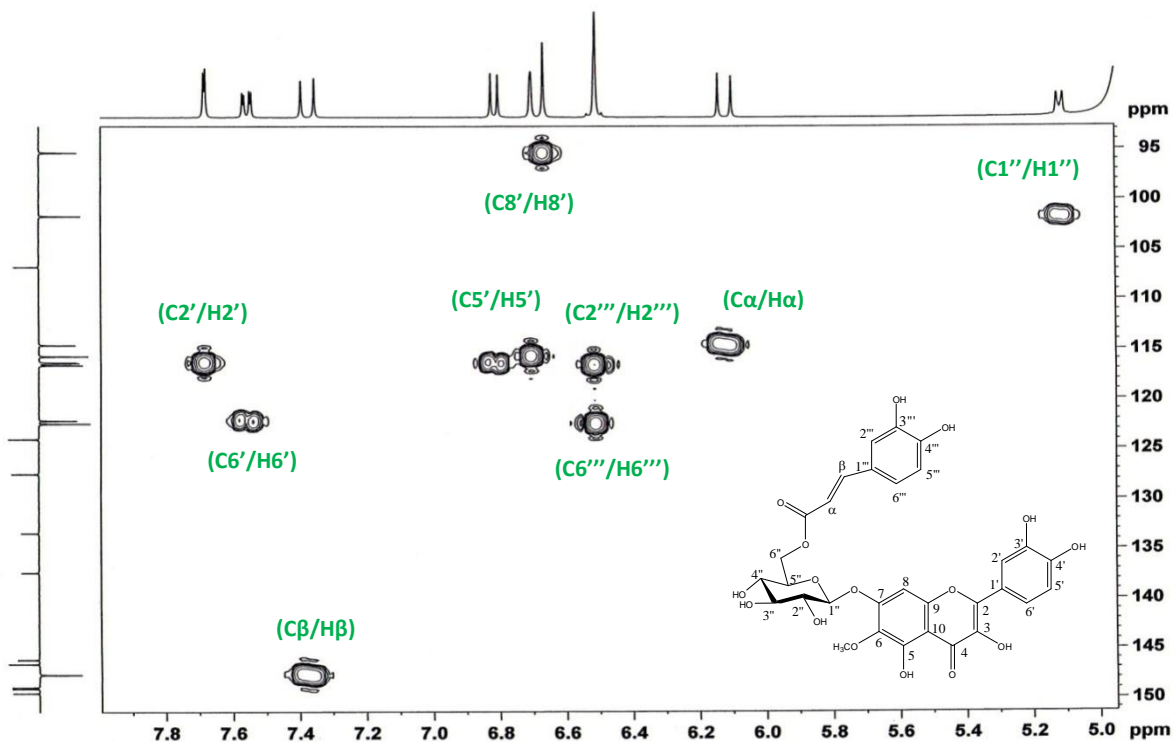
Spectre d.3 : Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 du composé 90109-12x15 (100 MHz, CD_3OD).



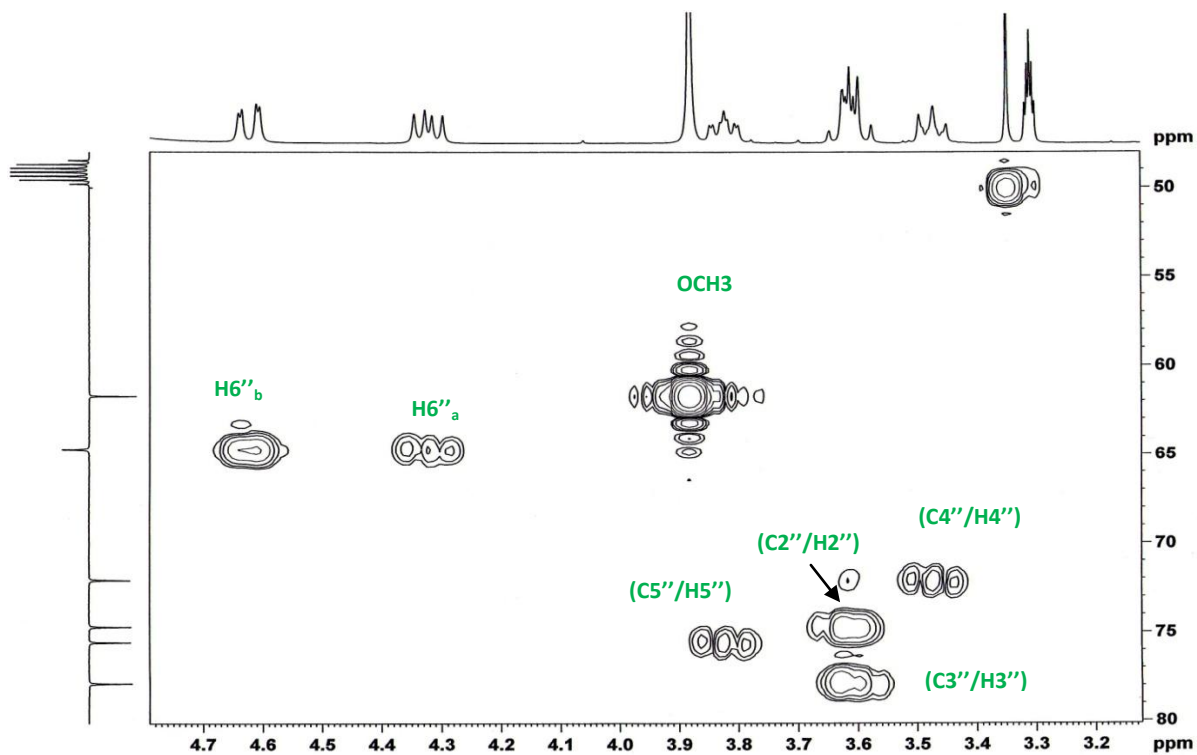
Spectre d.4 : Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 étalé (65 à 180 ppm) du composé 90109-12x15 (100 MHz, CD_3OD).



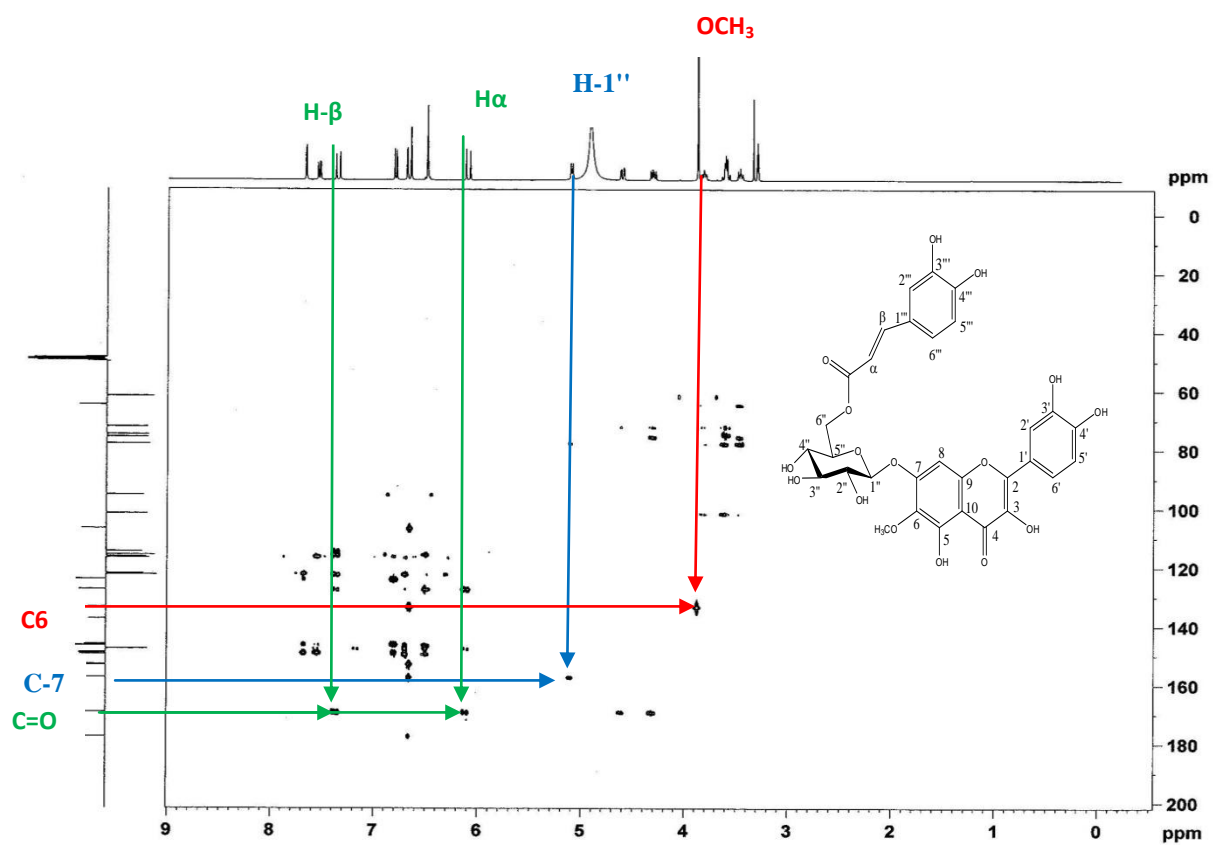
Spectre d.5 : Spectre Cosy étalé (3.4 à 5.2 ppm) du composé 90109-12x15 (400 MHz, CD_3OD).



Spectre d.6 : Spectre HMQC étalé (95 à 150 ppm) du composé 90109-12x15 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre d.7 : Spectre HMQC étalé (50 à 80 ppm) du composé 90109-12x15 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre d.8 : Spectre HMBC étalé (0 à 200 ppm) du composé 90109-12x15 (400 MHz, CD₃OD).

e. Elucidation de la structure du composé 130109-12à23

•Analyses physico-chimiques

- Le composé 130109-12à23 se présente sous forme de poudre jaune.
- Fluorescence sous lampe Wood : Jaune.
- $R_f = 0.44$ dans le système (Acétate d'éthyle/acide acétique/acide formique/ H₂O: 80 :5: 5:10).

•Analyses spectroscopiques

Le spectre de RMN ¹H enregistré dans le CD₃OD du composé 130109-12à23 (Spectres e.1) permet d'observer une ressemblance avec le produit précédent (90109-12x15) identifié comme étant : 7-*O*-[6-*O*-caffeoyl-glucoside]-6-méthoxyquercétine.

On observe de nombreux pics entre $\delta_H = 6.0$ ppm et $\delta_H = 7.8$ ppm, ce qui laisse présager la présence de plusieurs noyaux aromatiques dans la molécule.

Le signal du carbone anomérique et les signaux des cinq carbones caractéristiques d'un sucre confirment la présence d'un glucose : ($\delta_C = 99.6$ ppm, $\delta_C = 74.8$ ppm, $\delta_C = 75.8$ ppm, $\delta_C = 72.1$ ppm, $\delta_C = 75.8$ ppm et $\delta_C = 65.2$ ppm) attribués respectivement aux carbones C-1", C-2", C-3", C-4", C-5" et C-6".

Le spectre de RMN du proton étalé (Spectre e.2) présente des déplacements chimiques compatibles avec ceux observés pour la quercétine. En effet, on observe un système ABX à :

- $\delta_H = 7.72$ ppm (*d*, $J = 2.1$ Hz, 1H) attribué à H-2'.
- $\delta_H = 6.83$ ppm (*d*, $J = 8.5$ Hz, 1H) attribué à H-5'.
- $\delta_H = 7.6$ ppm (*dd*, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.5$ Hz, 1H) attribué à H-6'.
- Une substitution en 3' et 4'.

La présence d'un méthoxyle est caractérisée par l'apparition d'un singulet à $\delta_H = 3.89$ ppm, cela est confirmé par la RMN du ¹³C (Spectre e.2) par l'apparition d'un carbone à $\delta_C = 61.6$ ppm.

D'autre part et sur les mêmes spectres, on observe deux doublets à $\delta_H = 6.53$ ppm (*d*, $J = 8.2$ Hz, 1H) et à $\delta_H = 6.76$ ppm (*d*, $J = 1.7$ Hz, 1H) correspondant aux protons H-5''' et H-2''' et un doublet de doublet à $\delta_H = 6.57$ ppm correspondant à H6''' (*dd*, $J = 1.7$, $J = 8.2$ Hz, 1H) caractéristiques d'un noyau aromatique caféique.

Ces données additionnées supposent la présence d'un cycle aromatique substitué par deux groupements hydroxyles en C3''' et C4''' et comportant 3H attribués respectivement à 2''', 5''' et 6''').

On observe également deux doublets : à $\delta_H = 6.17$ ppm, H α (*d*, $J = 15.8$ Hz, 1H) et à $\delta_H = 7.42$ ppm, H β ($J = 15.8$ Hz, 1H) indiquant la présence de deux protons vicinaux d'une double

liaison de configuration *trans*. Par ailleurs, le spectre RMN ^{13}C (spectre e.2) montre entre autre la présence d'un groupement (C=O) d'ester conjugué à $\delta_{\text{C}} = 169,1$ ppm.

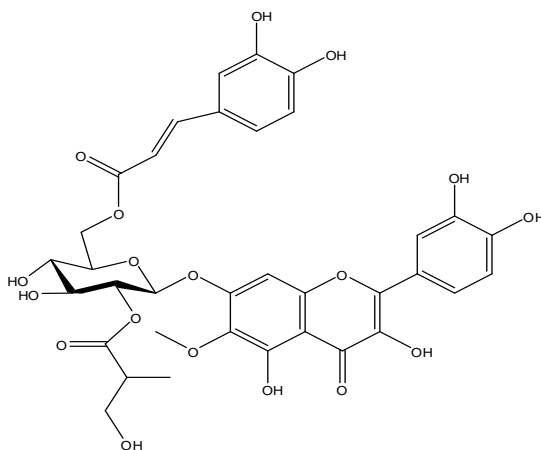
Le spectre de l'analyse HMBC (spectre e.11) montre des taches de corrélation entre les protons du groupement CH=CH et le carbone de l'ester permettant ainsi de les relier et confirmant la conjugaison du carbonyle de l'ester et de la double liaison formant ainsi un groupement caffeoyl. Sur ce même spectre on observe des taches de corrélation nettes entre le carbone du carbonyle ($\delta_{\text{C}} = 169,1$ ppm) et les protons H-6''a ($\delta_{\text{H}} = 4.38$ ppm) et H-6''b ($\delta_{\text{H}} = 4.65$ ppm) du glucopyranosyle menant ainsi à une jonction entre l'oxygène en C-6'' du glucose et le groupement caffeoyl.

Le spectre de l'expérience HMBC (spectre e.10) permet aussi de constater une corrélation entre le proton anomérique du glucose ($\delta_{\text{H}} = 5.36$ ppm) et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 157.1$ ppm attribué à C-7. Ce qui impose la substitution de ce noyau par le groupement 6'' caffeoyl-*O*- β -D-glucopyranosyle.

Les spectres HMBC e.8-e.10 montrent la présence d'un groupement méthyle à ($\delta_{\text{H}} = 1.22$ ppm) corrélié avec un carbone tertiaire $\delta_{\text{C}} = 43.7$ ppm d'une fonction CH, avec un carbone à $\delta_{\text{C}} = 65.3$ ppm d'une fonction CH₂OH et avec un groupement carbonyle C=O à $\delta_{\text{C}} = 175.7$ ppm. Ce dernier montre aussi une jonction avec l'oxygène en C2'' du glucose ($\delta_{\text{H}} = 5.14$ ppm), ce qui confirme la présence d'un groupement propanoyl attaché en position 2'' du glucose.

L'ensemble de ces données mène à la structure suivante, isolée et rapportée pour la première fois d'une source végétale, on peut la nommer:

7-*O*-[6-*O*-caffeoyl-2-*O*-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl)-glucoside]-6-méthoxyquercétine



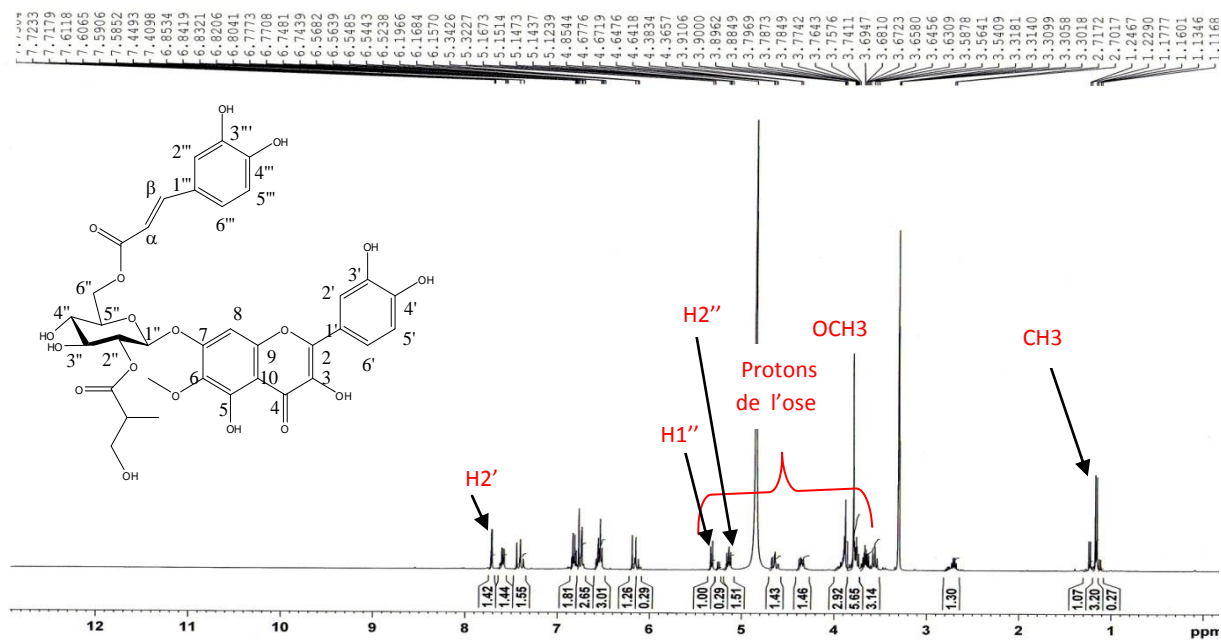
7-*O*-[6-*O*-caffeoyl-2-*O*-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl)-glucoside]-6-méthoxyquercétine

Le tableau III.8 rassemble les données spectroscopiques relatives à cette molécule.

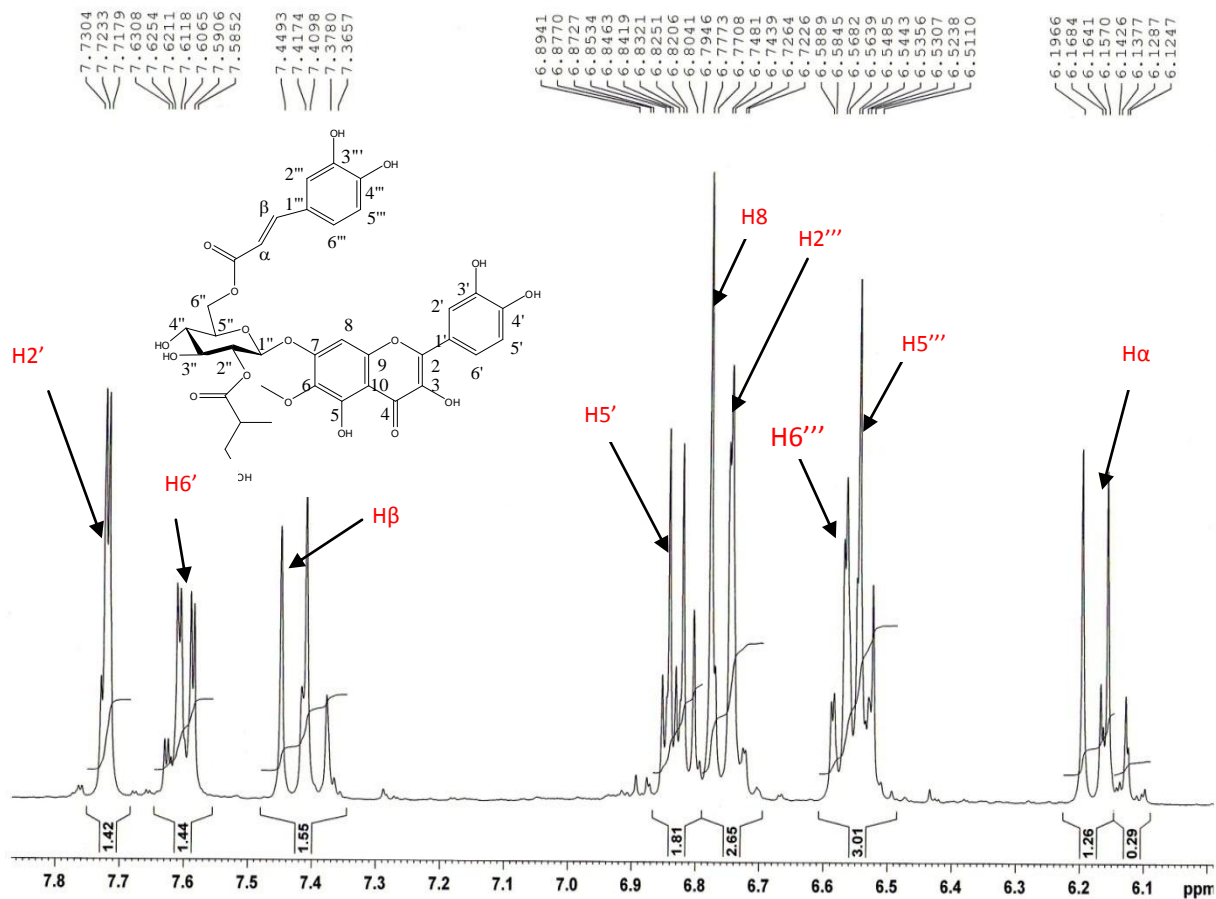
Tableau III.8 : RMN du ^1H et du ^{13}C (400 MHz, δ , J en Hz ; 100 MHz, δ) du composé 130109-12à23 dans le CD_3OD .

	Composé 130109-12à23	
	^1H	^{13}C
Génine	δ (ppm)	
2	-	149.1
3	-	137.5
4	-	177.5
5	-	153.3
6	-	133.7
7	-	157.1
8	6.77 s	95,4
9	-	152.9
10	-	107.0
1'	-	124,0
2'	7.72 d ($J= 2.1$ Hz, 1H)	116.3
3'	-	146.2
4'	-	149,1
5'	6.83 d ($J= 8.5$ Hz, 1H)	116.3
6'	7.6 dd ($J= 2.1$ Hz, $J= 8.5$ Hz, 1H)	122.0
O-CH ₃ - (C ₆)	3.89 s (3H)	61.6
Glucose		
1"	5.33 d ($J= 7.9$ Hz, 1H)	99.6
2"	5.14 t ($J=9.4$ Hz, 1H)	74.8
3"	3.78 t ($J=9.3$ Hz, 1H)	75.8
4"	3.56 t ($J=9.3$ Hz, 1H)	72.1
5"	3.89 m	75.8
6"	a : 4.35 dd ($J= 12.0$, $J=7.1$ Hz, 1H) b : 4.66 dd ($J= 2.3$ Hz, $J= 12.0$ Hz, 1H)	65.2
Caffeoyl		
α	6.17 d ($J= 15.8$ Hz, 1H)	114.5

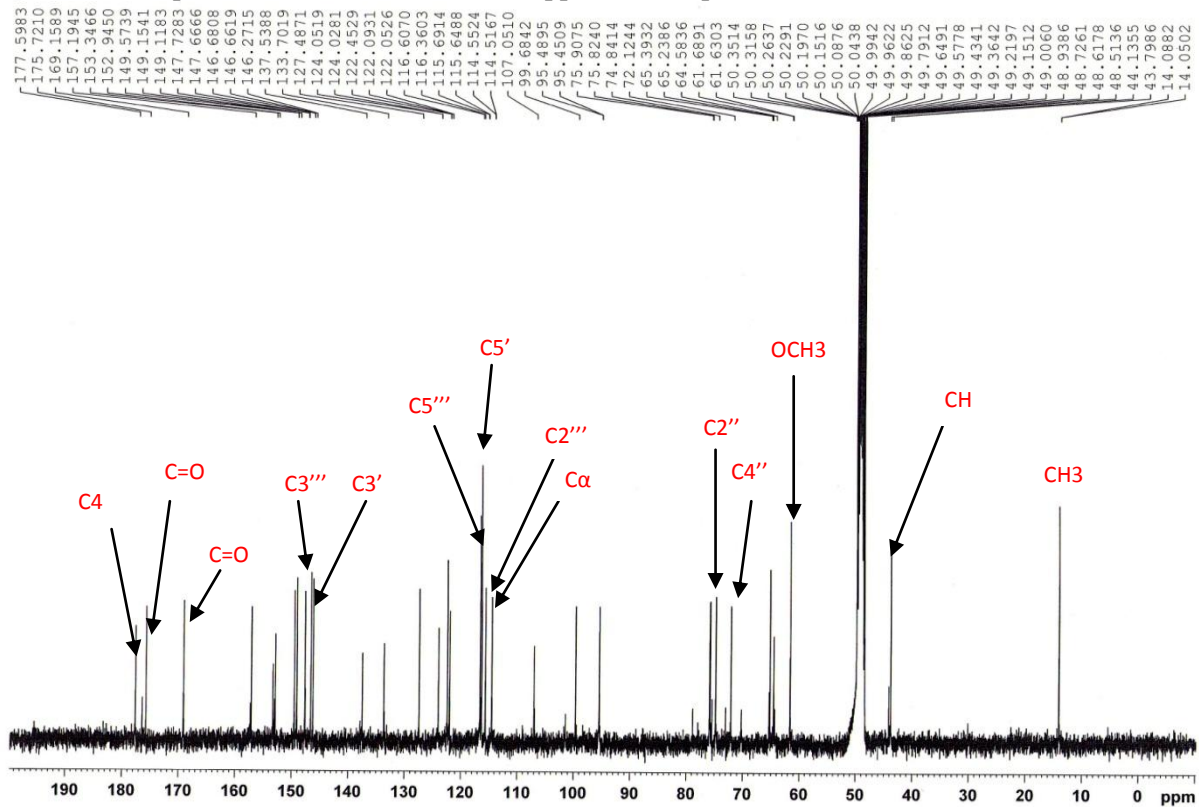
β	7.42 d ($J= 15.8$ Hz, 1H)	147.7
1'''	-	127,4
2'''	6.76 d ($J= 1.7$ Hz, 1H)	115.6
3'''	-	146.6
4'''	-	149.5
5'''	6.53 d ($J= 8.2$ Hz, 1H)	116.6
6'''	6.57 dd ($J= 1.7$ Hz, $J= 8.2$ Hz, 1H)	122.4
CO	-	169.1
Propanoyl		
CO (C ₂ '')	-	175.7
CH	Sextup, 2,71 ppm ($J= 6.20$ Hz, 1H)	43.7
CH ₃	1.16 d (3H) ($J= 7.0$ Hz, 3H)	14.0
CH ₂ OH	Ha= 3,78 dd ($J=6,6$ Hz ; $J=10,9$ Hz) Hb=3,65 dd ($J= 5,9$ Hz ; $J=10.8$ Hz)	65.3



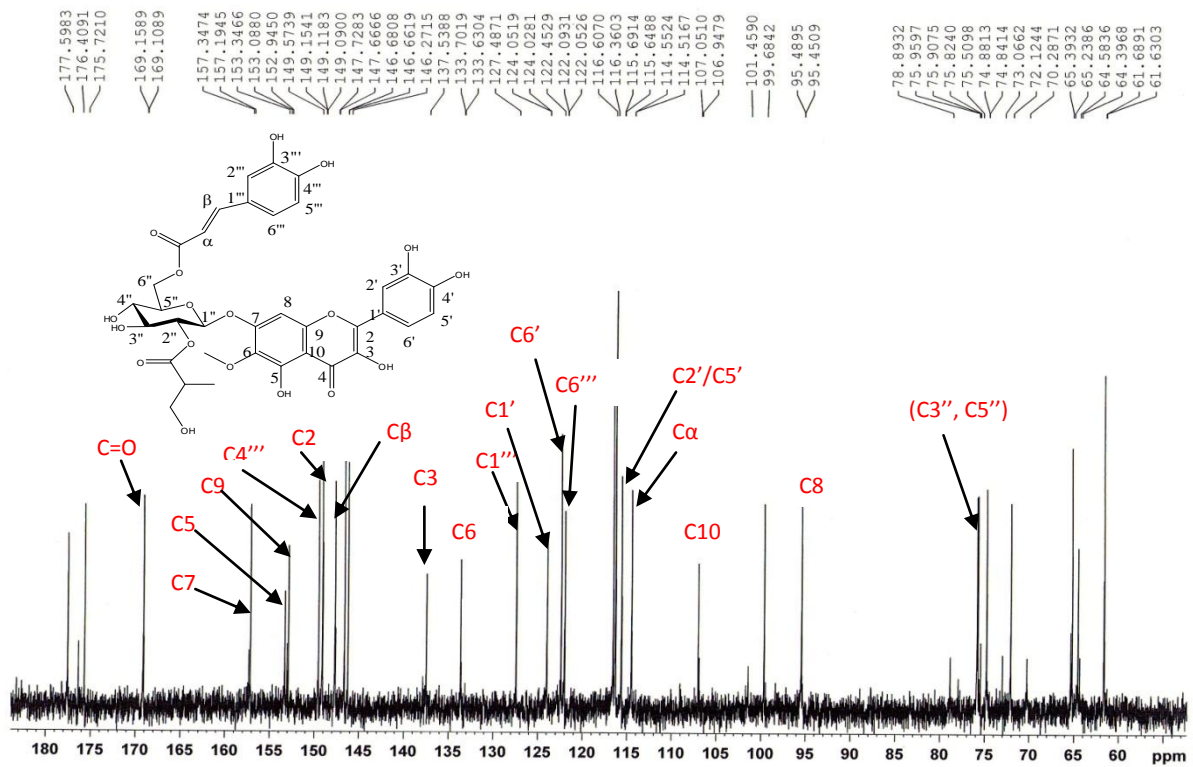
Spectre e.1: Spectre RMN ¹H du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD₃OD)



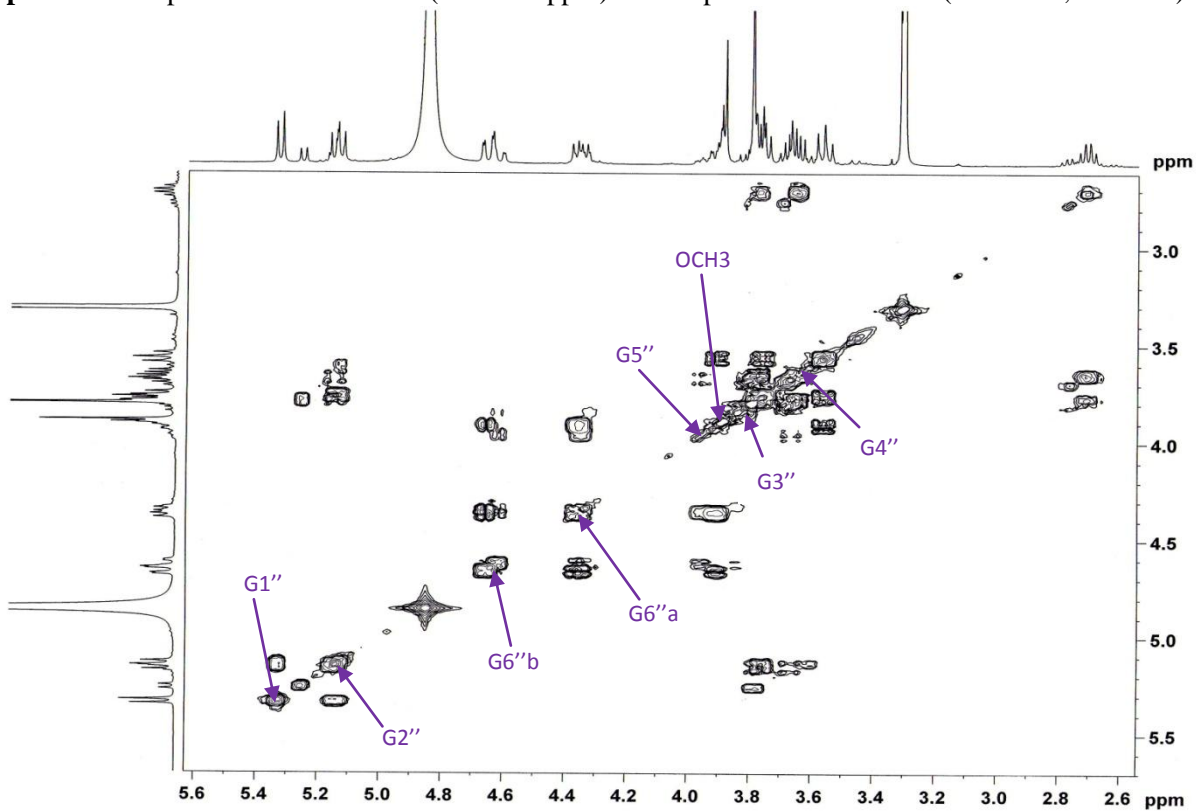
Spectre e.2 : Spectre RMN ^1H étalé (6.1 à 7.8 ppm) du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD_3OD).



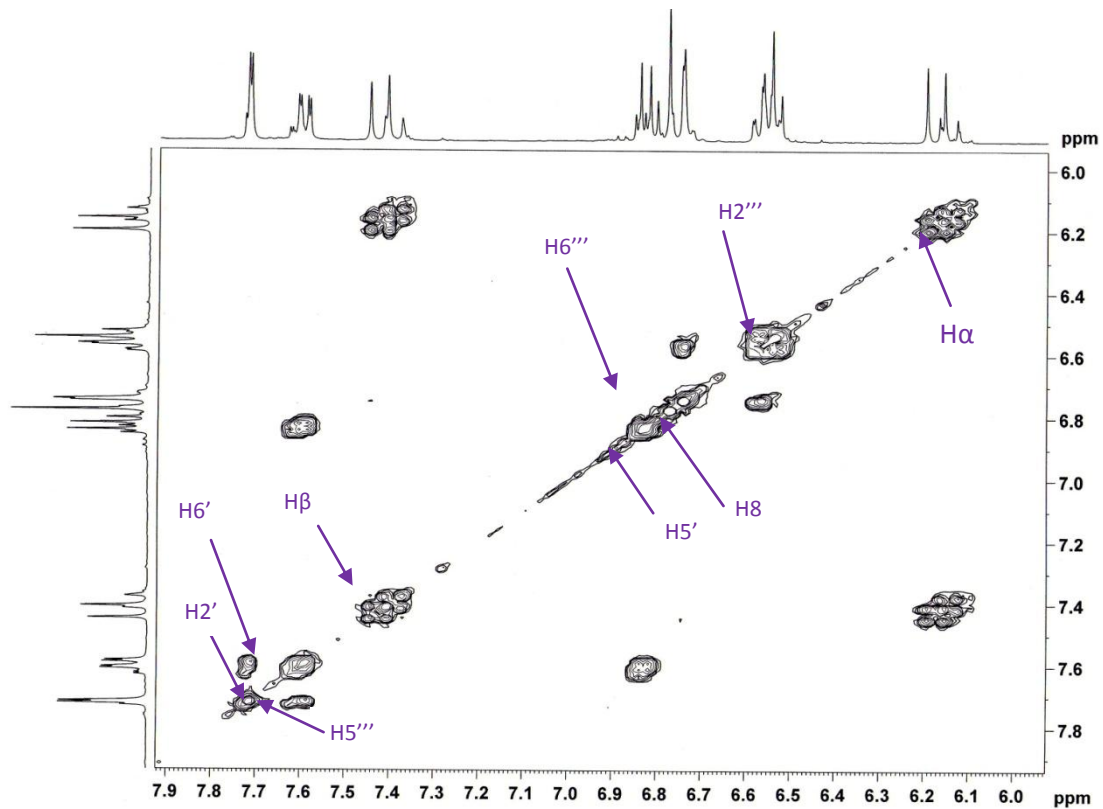
Spectre e.3 : Spectre RMN ^{13}C du composé 130109-12a23 (100 MHz, CD_3OD).



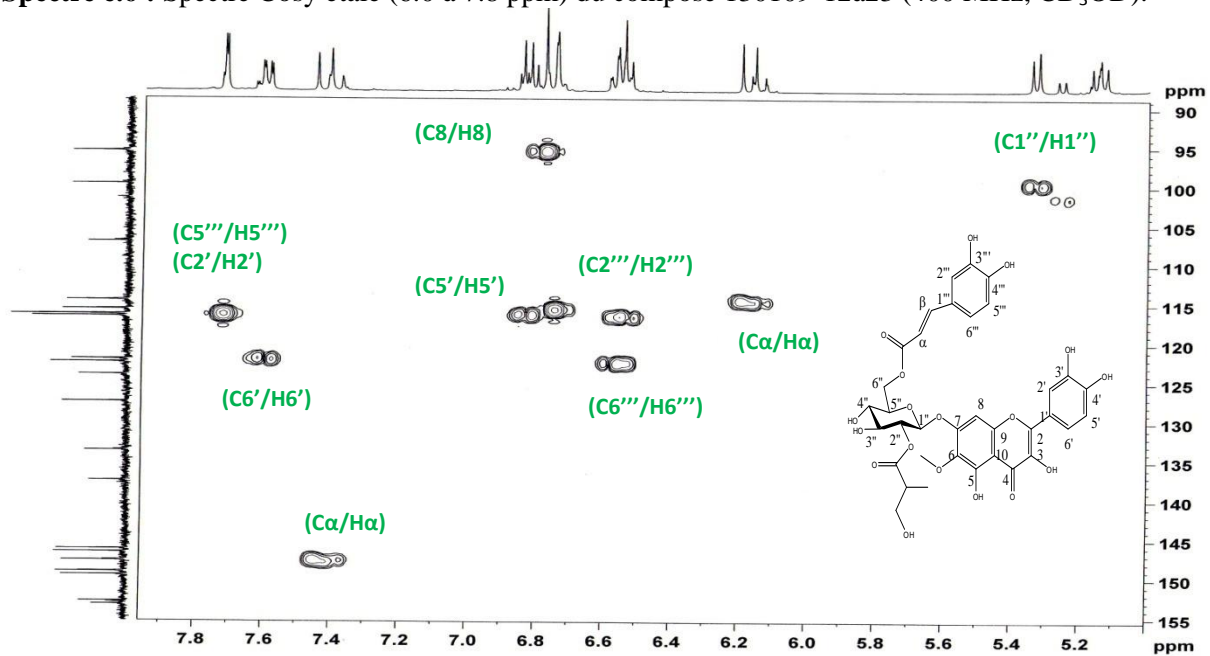
Spectre e.4 : Spectre RMN ^{13}C étalé (60 à 180 ppm) du composé 130109-12a23 (100 MHz, CD_3OD).



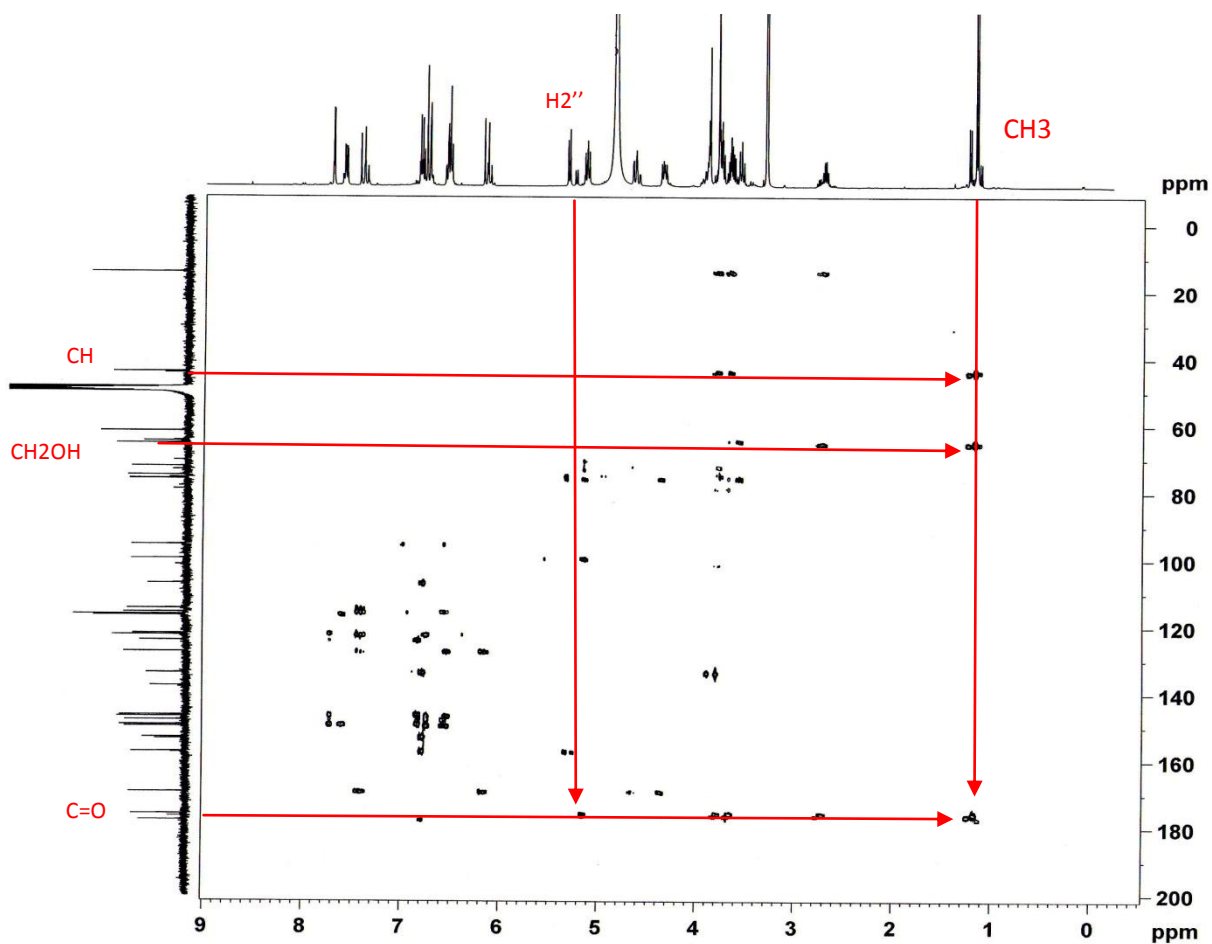
Spectre e.5 : Spectre Cosy étalé (3.0 à 5.5 ppm) du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD_3OD).



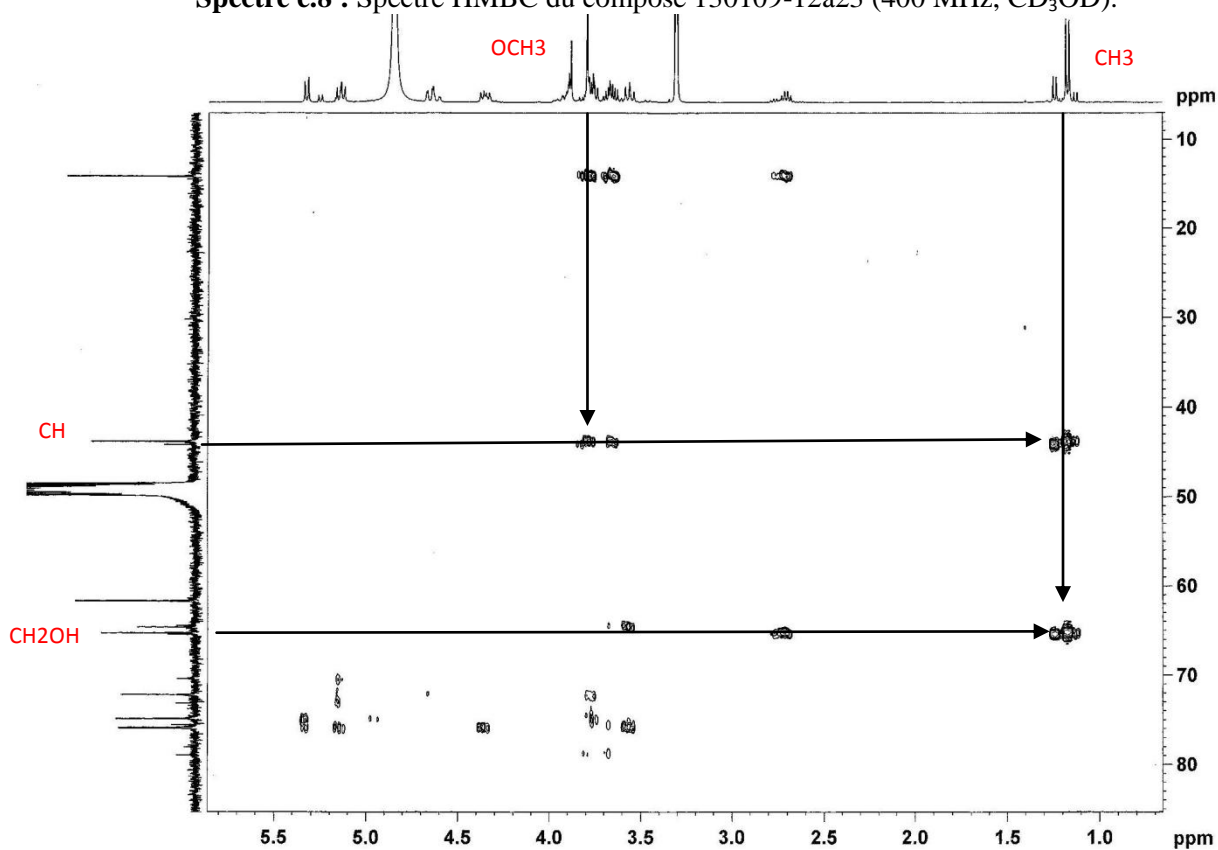
Spectre e.6 : Spectre Cosy étalé (6.0 à 7.8 ppm) du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD₃OD).



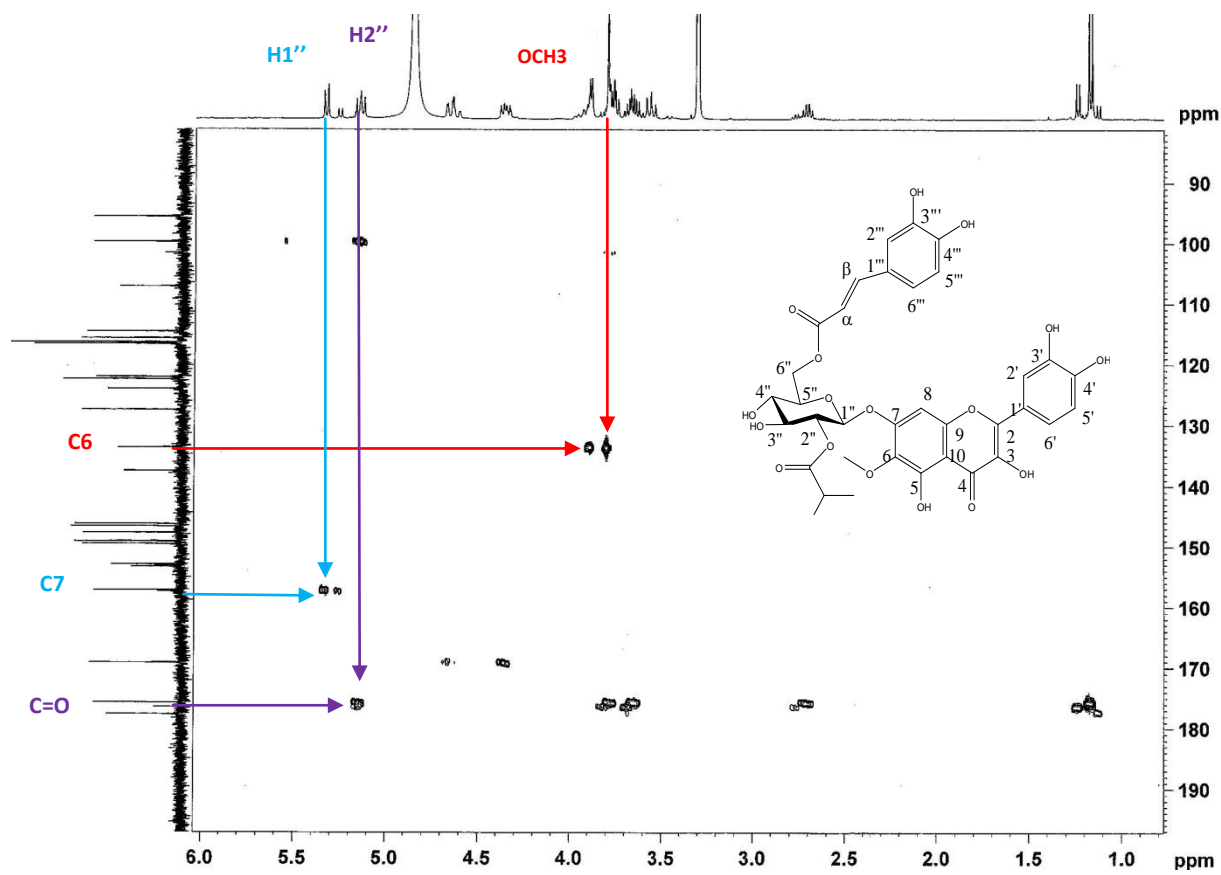
Spectre e.7 : Spectre HMQC étalé (90 à 155 ppm) du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD₃OD).



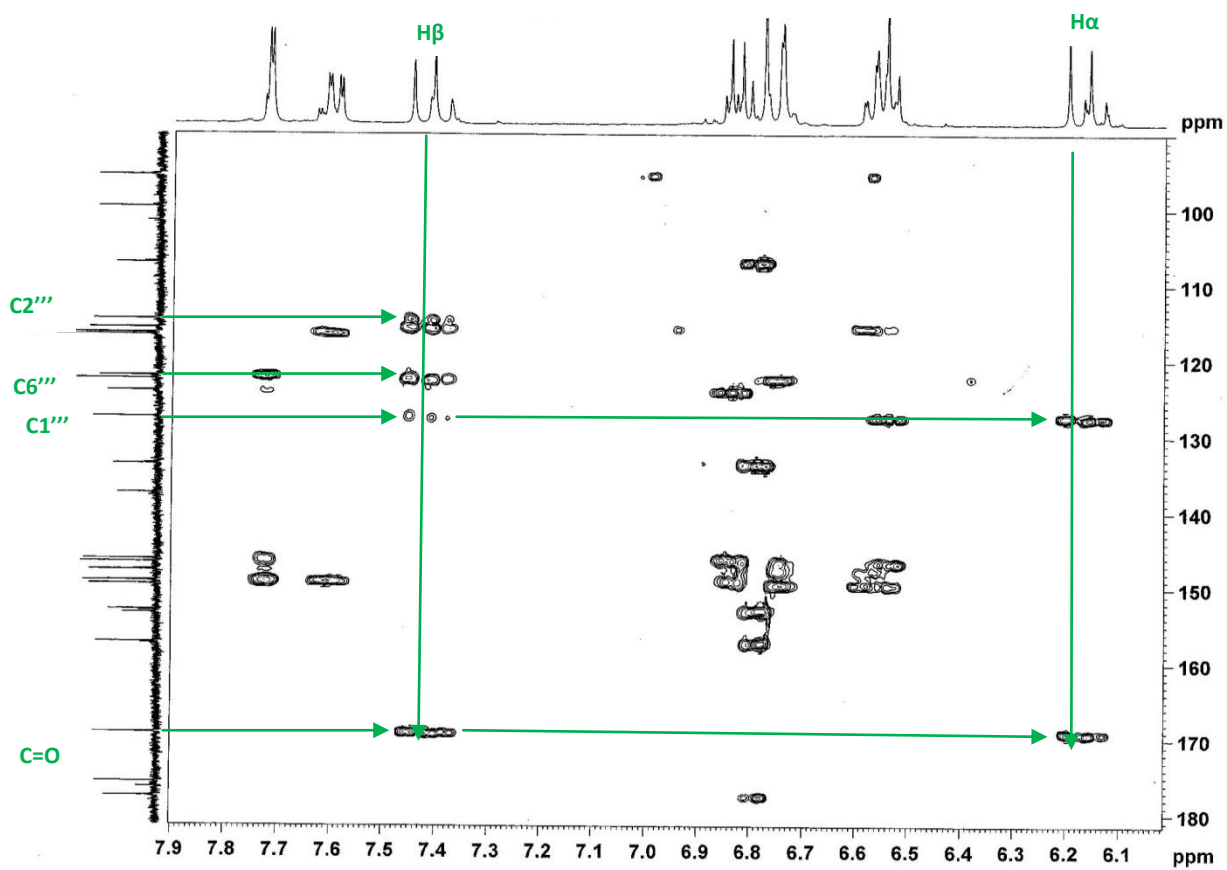
Spectre e.8 : Spectre HMBC du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre e.9 : Spectre HMBC du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD₃OD).



Spectre e.10: Spectre HMBC étalé (1-6 ppm) du composé 130109-12a23 (400 MHz, CD_3OD).



Spectre e.11 : Spectre HMBC étalé (6.1-7.8ppm) du composé 130109-12a23 (400).

IV. Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des plantes et des produits purs isolés.

IV.1 Matériel Végétal

Durant cette étude, nous avons travaillé sur les deux extraits bruts butanolique et acétate d'éthyle d'*Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* ainsi que les cinq produits majoritaires purs de la phase butanolique d'*Asteriscus maritimus* :

150109-10	6-méthoxy-7-O-β-glucoside quercétine
130109-10	3-O-β-rutinoside quercétine
130109-19 à 23	7-O-[6-O-caffeoyl-2-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucoside]-6-méthoxyquercétine
21b0109-21à23	6-méthoxy-7-O-β-[-6-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucoside] quercétine
090109-12x15	7-O-[6-O-caffeoyl-glucoside]-6-méthoxyquercétine

IV.2 Mesure de l'activité anti-oxydante

IV.2.1 Test d'activité anti DPPH

•Principe

Le test présenté dans ce chapitre va nous permettre d'évaluer l'activité anti-oxydante des extraits bruts des deux plantes et cinq produits purs. Le principe est de mesurer leur capacité à inhiber le radical stable \longrightarrow 1,1-Diphényl-2-Picryl-Hydrazyl ou DPPH (Figure IV.1).

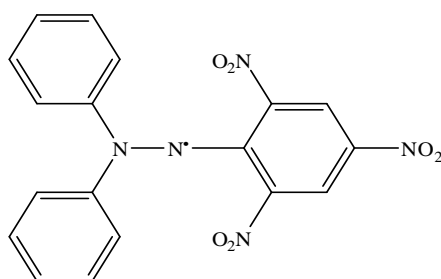


Figure IV. 1 : Formule du radical DPPH

Ce radical est souvent utilisé pour estimer l'activité antioxydante de nombreux composés, dont les composés phénoliques.

La première étape de la réaction est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical DPPH, pour donner du diphénylpicrylhydrazine et un radical

phénoxy (Figure IV.2). Cette étape est la première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats obtenus, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé.

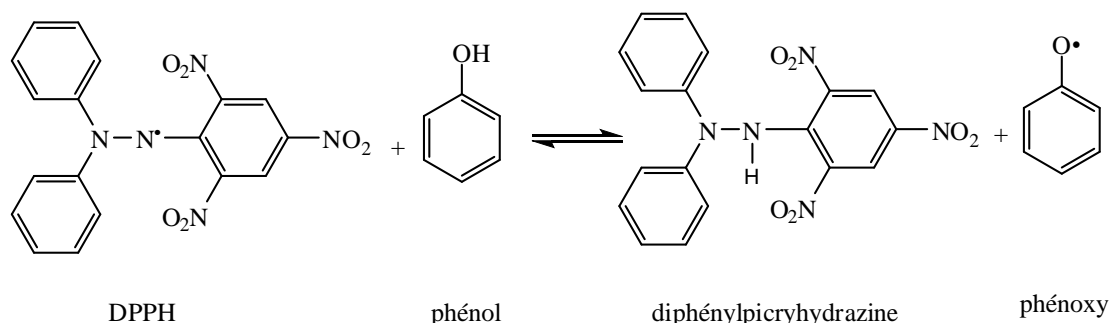


Figure IV.2 : Réaction du radical DPPH avec un phénol.

L'utilisation du DPPH présente plusieurs avantages :

- ✓ Il forme un spectre caractéristique en RPE qui est facilement détectable.
- ✓ Il est stable au cours du temps.
- ✓ Il est compatible avec tous les solvants utilisés lors de notre étude.

Le signal de réaction est obtenu en mélangeant, à volume égal, une solution éthanolique du radical DPPH ($5 \cdot 10^{-4} \text{M}$) avec le solvant des fractions étudiées. La double intégral du signal obtenu est proportionnelle à la quantité de radicaux libres présents dans la solution. Une nouvelle mesure, effectuée avec la solution du radical DPPH et l'extrait à tester (1:1), a pour effet de diminuer le nombre de radicaux libres et entraîner donc une baisse du signal (Schéma IV.3). Une nouvelle mesure de la double intégrale du signal permet la quantification de l'activité antioxydante [1,2].

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du signal de référence. Il est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{ref-extrait})}{(\text{ref-bdf})}$$

Dans cette formule,

ref : représente la double intégrale du signal de référence composé du mélange DPPH et du solvant.

extrait : est la double intégrale du signal correspondant à la mesure qui se compose de DPPH et de l'extrait de plante.

bdf : est la mesure du bruit de fond occasionné par le solvant seul (sans DPPH).

Chaque mesure est effectuée à trois reprises.

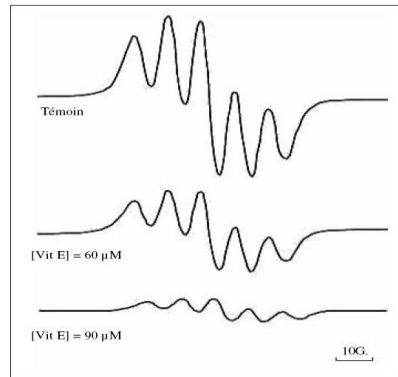


Figure IV.3 : Evolution du spectre RPE du radical du DPPH dans L'éthanol en fonction de différentes concentrations de vitamine E.

Lorsque cette manipulation est effectuée à différentes concentrations d'extraits étudiés, la trace d'une courbe % inhibition en fonction de la concentration permet la détermination de la CI_{50} , concentration permettant l'inhibition de 50% du signal de référence.

L'erreur relative sur la détermination de l'inhibition est calculée à partir de la formule suivante :

$$\frac{\Delta I}{I} = \frac{E-B}{(R-E)(R-B)} \times \frac{\Delta R}{R} + \frac{E}{R-E} \times \frac{\Delta E}{E}$$

$\Delta I/I$, $\Delta R/R$, $\Delta E/E$ sont les précisions respectives sur l'inhibition, la référence l'extrait. **I** est la mesure de l'inhibition, **E** celle de l'extrait, **R** celle de la référence, **B** celle du bruit de fond.

La réduction du radical DPPH induit un changement de couleur du violet au jaune, qui peut être suivi facilement par spectrophotométrie en mesurant la décroissance de l'absorption à 517 nm [3-5].

Toutefois, malgré la précision de cette technique, les mesures faites par RPE restent plus sensibles et permettent de travailler avec des quantités plus faibles de produits.

•Mode opératoire

a. Réaction

Nous mélangeons 50µl de solution éthanolique de DPPH ($5 \cdot 10^{-4}M$) et 50µl d'extrait de plantes à concentrations variables (solvant différent selon l'extrait). Le mélange est agité vigoureusement à l'aide d'un agitateur pendant 5 secondes, introduit dans un microtube en quartz de 100µl puis placé dans la cavité de mesure de la RPE. La mesure est effectuée 3 minutes après que les réactifs aient été mis en présence.

b. Mesure

Le spectre RPE caractéristique du radical DPPH est mesuré à l'aide du spectromètre ESP300E Bruker. Les paramètres de mesures sont les suivants :

- modulation de fréquence : 100 kHz
- fréquence micro-onde : 9,78 GHz
- puissance micro-onde : 4 mW
- modulation d'amplitude : 1,97 G
- temps de conversion : 5,12 msec
- constante de temps : 11 msec

Le gain doit être modifié en fonction des solvants utilisés. Les mesures sont effectuées à température ambiante. Le spectre obtenu est la somme de deux balayages successifs, ceci afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

IV.3. Mesure du taux de polyphénols

Afin de déterminer la quantité de polyphénols totaux présents dans les extraits bruts de plantes étudiées, nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu [6,7].

•Principe

Les polyphénols, mis en présence du carbonate de sodium, conduisent à une forme ionisée, l'ion phénolate. Par ajout du réactif de Folin-Ciocalteu ou réactif phosphomolybdotungstique (mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique) l'ion phénolate est oxydé puis simultanément réduit en donnant une solution colorée bleue dont on détermine l'absorbance.

•Mode opératoire

Pour effectuer ces mesures, nous avons suivi le protocole décrit dans la Pharmacopée Européenne 2001. Cette méthode de mesure va nous permettre d'évaluer la quantité de

polyphénols totaux, contenus dans les extraits étudiés. Le taux de ces composés est déterminé par rapport à une solution témoin de pyrogallol.

Pour chaque extrait de plante, nous avons préparé 25ml de solution mère contenant environ 50 mg ($m_1/10$) d'extrait.

Rq : La méthode que nous avons utilisée est basée sur un mode de calcul prenant en compte la concentration massique des composés à doser. Afin de diminuer les quantités de produit nécessaire à ce dosage, nous avons réalisé les solutions mères dans un volume dix fois inférieur à celui préconisé par le protocole original. Pour cette raison, nous devons, lors du calcul final, multiplier par dix les masses d'extraits initialement pesées.

a. Détermination de l'absorbance des polyphénols totaux

Afin de déterminer le taux de polyphénols totaux, il faut dans un premier temps réaliser une dilution au 1/5 de la solution mère d'extrait de plante. Puis, 2ml de cette solution sont prélevés et introduits dans une fiole. On ajoute à cette solution 1ml de réactif phosphomolybdotungstique (Folin-Ciocalteu) et 10ml d'eau distillée. Pour finir, on ajoute au mélange 12 ml d'une solution de carbonate de sodium à 290g/l réalisée dans l'eau distillée.

Après agitation, le mélange est laissé au repos à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Au bout de ces 30 minutes, l'absorbance (A_{TX}) de la solution est mesurée à 760nm au spectrophotomètre en utilisant l'eau comme liquide de compensation.

b. Mesure de l'absorbance du témoin pyrogallol

La première étape consiste à réaliser une solution mère de pyrogallol à 50mg de pyrogallol (m_2) dans 100ml d'eau distillée. Cette solution mère est ensuite diluée au 1/20. On mélange ensuite dans une fiole 2ml de la solution de pyrogallol (au 1/20), 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu, 10ml d'eau distillée et 12ml de solution de carbonate de sodium à 290g/l.

Le mélange est agité puis son absorbance (A_P) est mesurée à 760nm après 30 minutes de repos à l'abri de la lumière.

c. Mode de calcul

Une formule prenant en compte la masse des extraits de plante utilisée ainsi que la masse et les caractéristiques physico-chimiques du pyrogallol va nous permettre de calculer directement le pourcentage de chacun des éléments recherchés.

Le pourcentage de polyphénols totaux présents dans un extrait exprimé en équivalent pyrogallol est calculé par la formule suivante :

$$\text{Polyphénols totaux (\%)} = \frac{(62.5 \times A_{TX} \times m_2)}{(A_p \times m_1)}$$

Dans cette formule les masses m_1 et m_2 sont exprimées en grammes.

IV.4 Détermination de l'activité antioxydante

Le premier test consiste à mesurer la capacité des extraits et les produits purs à inhiber le radical stable DPPH. Il permet de mesurer le pouvoir réducteur des extraits. La mesure est effectuée par RPE, 3 minutes après que le mélange de l'extrait étudié et d'une solution éthanolique de DPPH ait été réalisé. Les résultats sont exprimés en termes de CI_{50} , concentration permettant d'inhiber 50% du signal de référence. Le signal de référence est la mesure du signal obtenu lors du mélange de la solution de DPPH et du solvant dans lequel les extraits et le produit pur ont été solubilisés (ici, l'eau distillée).

Le second test consiste à déterminer la teneur en composés phénoliques des extraits bruts de plantes. Cette mesure a été effectuée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Les valeurs mesurées sont exprimées en g/100g d'extraits et sont déterminées par rapport à un composé de référence, le pyrogallol.

IV.4.1. Tests d'activité antioxydante

IV.4.1.1. Inhibition du radical DPPH

Nous avons déterminé la CI_{50} d'extraits des plantes et les produits purs. D'une part, nous pourrions ainsi comparer leurs activités avec les molécules de référence, quercétine et vitamine E. D'autre part, nous allons essayer d'établir une relation entre l'activité antioxydante et le taux de composés phénoliques.

Les valeurs des CI_{50} sont présentées dans le tableau IV.1. Les CI_{50} de la quercétine, et de la vitamine E, sur le test DPPH, sont également données sur le même tableau (IV.1).

Tableau IV.1 : CI_{50} des extraits bruts et les produits purs pour le test antioxydant

	CI_{50} DPPH ($\mu\text{g/ml}$)
Extrait butanolique d' <i>Asteriscus maritimus</i>	45 ± 0.5
Extrait a.d'éthyle de <i>Chrysanthemum trifurcatum</i>	199 ± 2.2
130109-10	$28,8 \pm 1,4$
130109-19x23	$12,1 \pm 1,9$
150109-10	$13,4 \pm 2,4$
90109-12x15	$13,2 \pm 0,4$
21b0109-21x23	$15,1 \pm 0,6$
Quercétine	12
Vitamine E	25

Pour ce test, des composés de référence comme, la vitamine E ou la quercétine ont une CI_{50} de 0,025 mg/ml et 0,012 mg/ml, respectivement.

Les figures suivantes représentent l'effet inhibiteur de ces extraits et les cinq produits purs sur le radical DPPH.

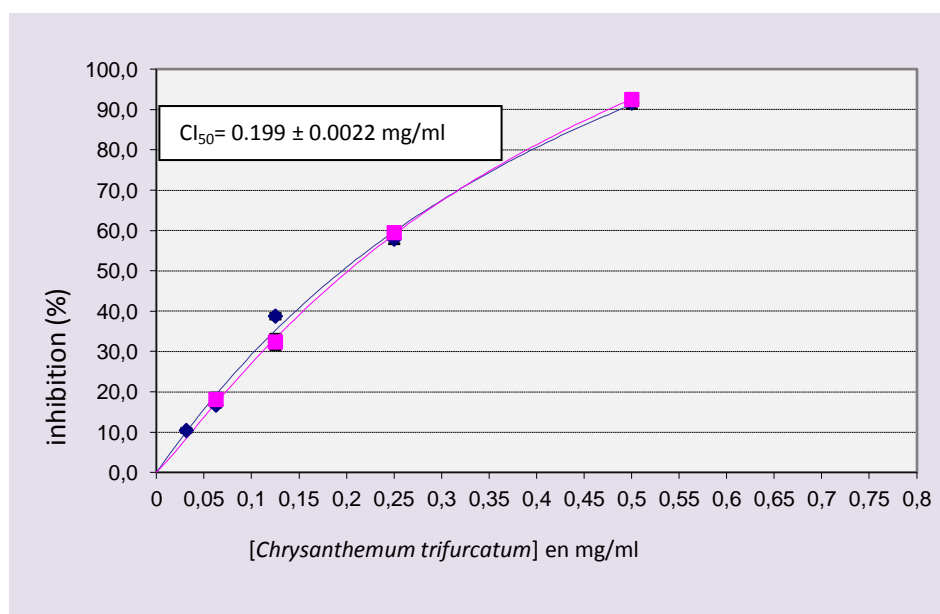


Figure IV.4 : Effet inhibiteur de l'extrait ac. d'éthyle du *C. trifurcatum* sur le radical DPPH.

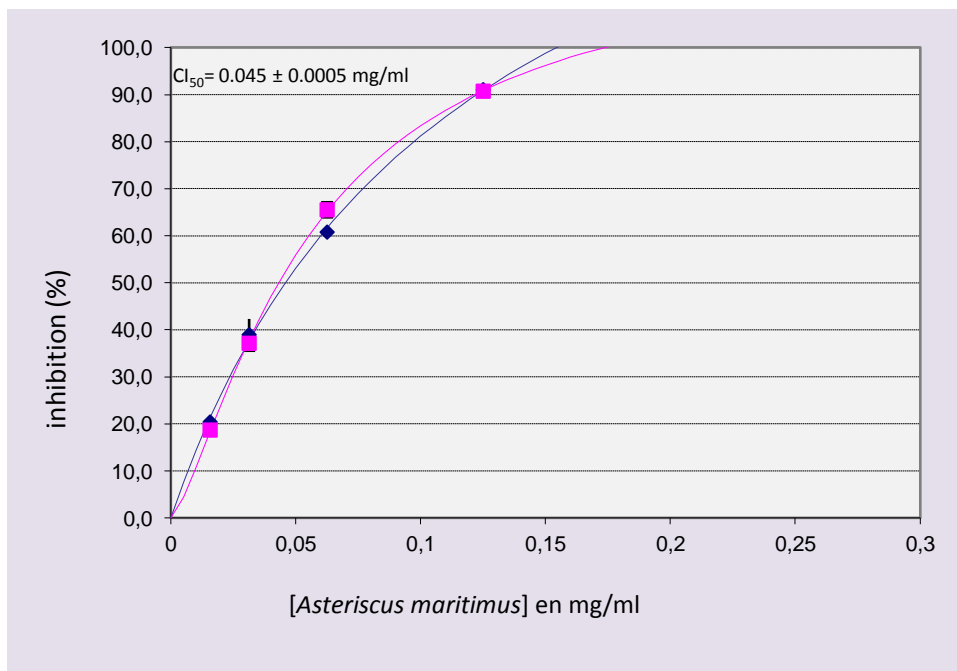


Figure IV.5 : Effet inhibiteur de l'extrait butanolique d'*A. maritimus* sur le radical DPPH.

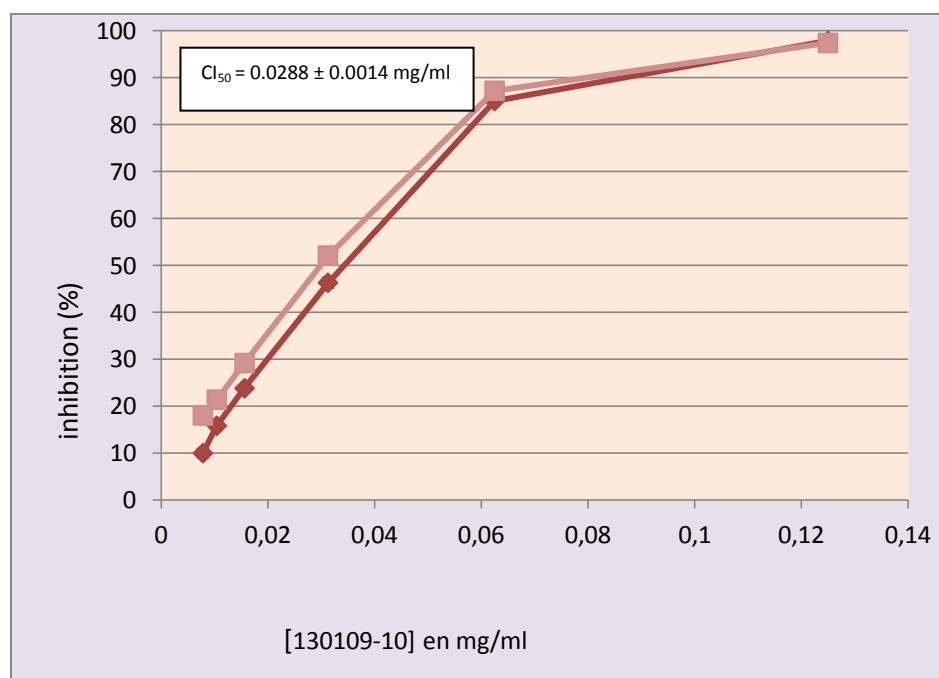


Figure IV.6 : Effet inhibiteur du produit 130109-10 sur le radical DPPH.

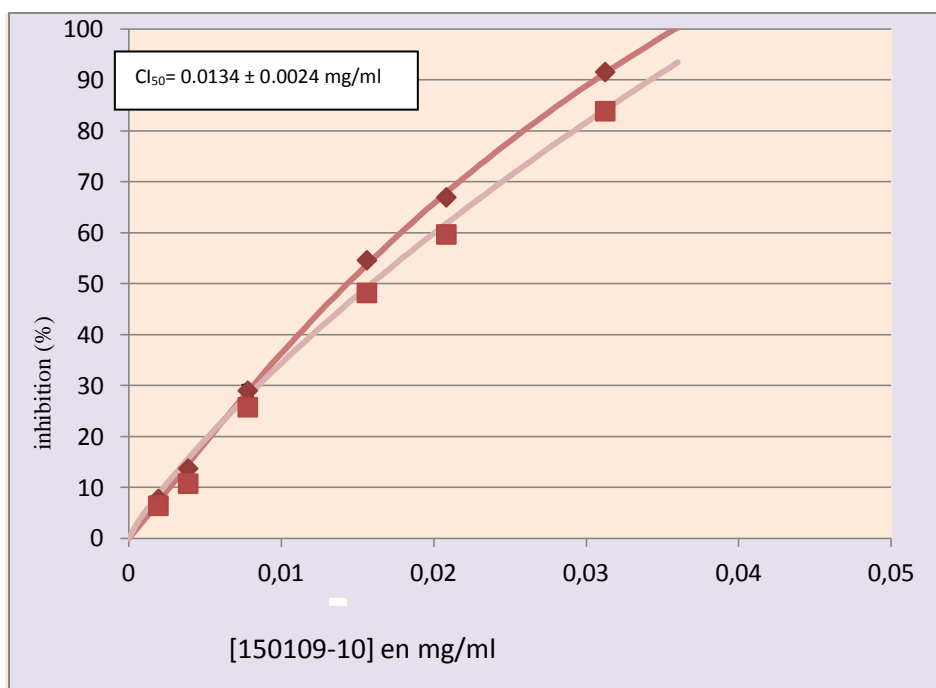


Figure IV.7 : Effet inhibiteur du produit 150109-10 sur le radical DPPH

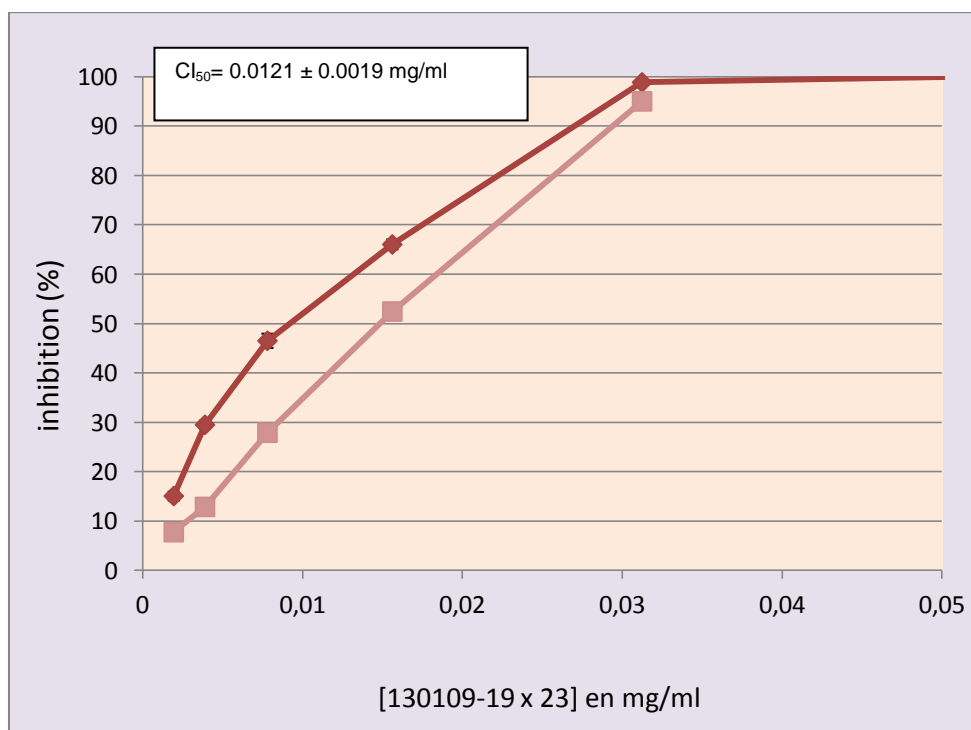


Figure IV.8 : Effet inhibiteur du produit 130109-19x23 sur le radical DPPH

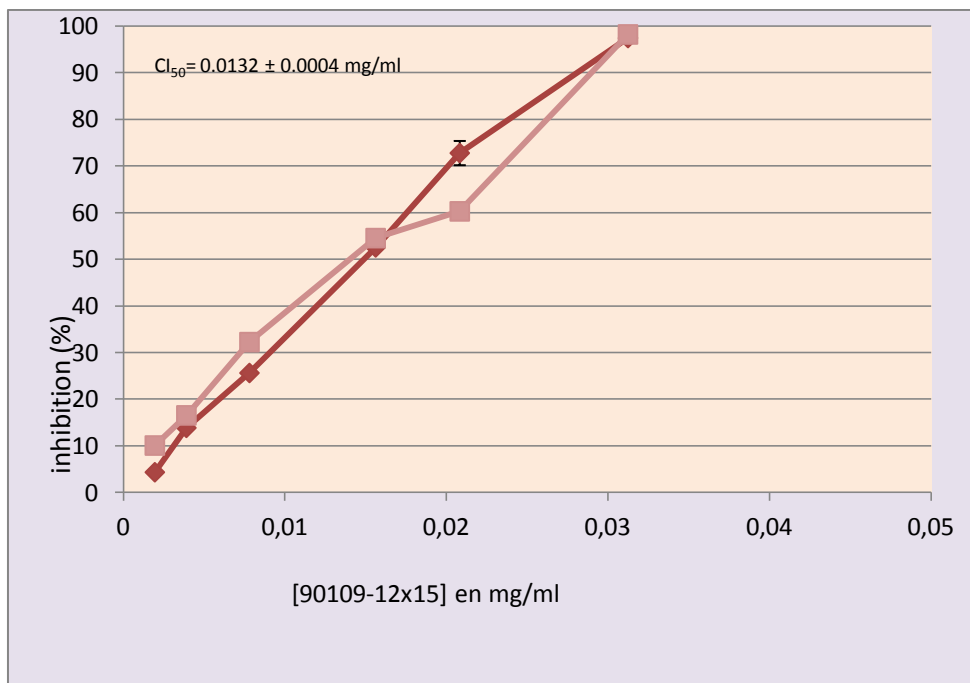


Figure IV.9 : Effet inhibiteur du produit 90109-12x15 sur le radical DPPH.

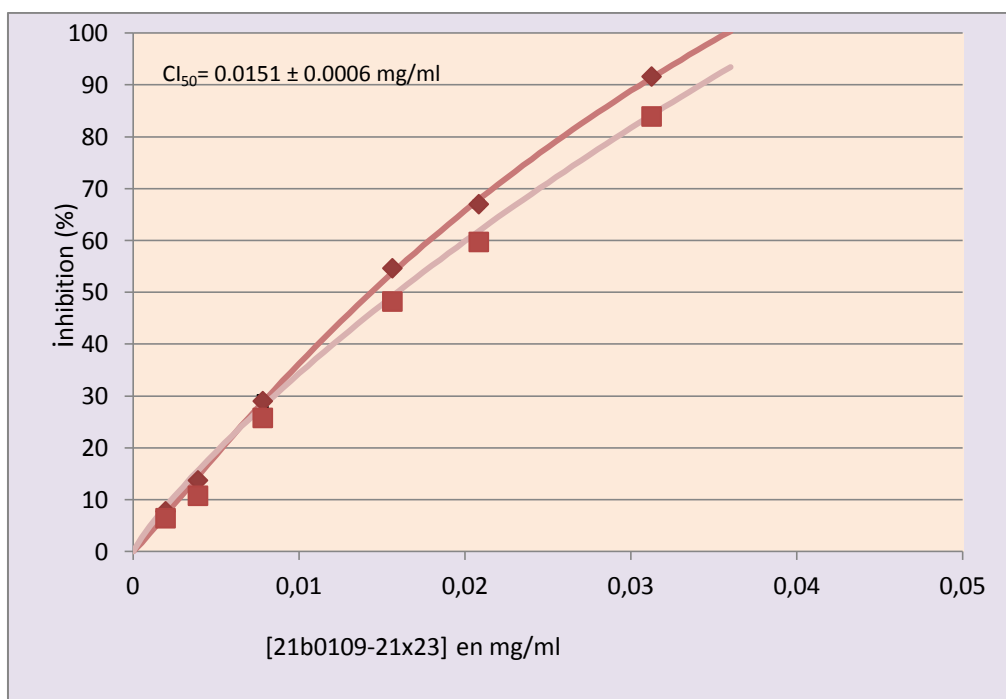


Figure IV.10 : Effet inhibiteur du produit 21b0109-21x23 sur le radical DPPH

IV.4.1.2. Détermination du contenu des extraits en composés phénoliques

Ce taux a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu, en utilisant comme standard le pyrogallol. Les résultats de ces mesures sont répertoriés dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2: Taux de composés phénoliques des extraits butanoliques de deux plantes étudiées.

Extrait	Composés Phénoliques (g/100g équiv.Pyrogallol)	CI ₅₀ DPPH (µg/ml)
<i>C. trifurcatum</i>	07.23 ± 0.3	199 ± 2.2
<i>A. maritimus</i>	21.24 ± 0.2	45 ± 0.5

Le tableau IV.2 nous montre la quantité de composés phénoliques des extraits. Ce taux de 07.23 et 21.24 g/100g (*C. trifurcatum* et *A. maritimus*, respectivement).

Les polyphénols sont un groupe important de composés pharmacologiquement actifs possédant une activité antioxydante [8].

IV.5. Discussion des résultats

Pour cette étude, nous avons émis l'hypothèse que les plantes étudiées pouvaient être une source potentielle d'antioxydants naturels. Les résultats observés lors des tests antioxydants ont confirmé cette hypothèse. Nous avons observé que les extraits des deux plantes et les cinq flavonoïdes sont capables d'inhiber le radical stable DPPH. Les plus efficaces d'entre eux présentent une activité très proche, à certains antioxydants de référence tels que la vitamine E ou la quercétine.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus (Figures IV.4 et IV.5) révèlent que l'extrait d'*Asteriscus maritimus* comparé à l'extrait de *Chrysanthemum trifurcatum* est de loin le plus actif, les CI_{50} de chacun des différents extraits ont été déterminées (Tableau IV.2).

À des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés, la quercétine et la vitamine E. Leur activité antiradicalaire est très puissante, les CI_{50} sont de l'ordre de 12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ et 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ respectivement.

L'activité antiradicalaire manifestée par l'extrait brut d'*Asteriscus maritimus* avec une CI_{50} de l'ordre de 45 $\mu\text{g}/\text{mg}$ est seulement 2 à 3 fois moins active que la vitamine E et la quercétine, interprétée aussi par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'extrait et elle est relative avec la teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques (21.24 g/100g équiv. Pyrogallol). On a constaté qu'il y a une corrélation et une relation linéaire entre la teneur de cet extrait en flavonoïdes et en polyphénols totaux et l'activité antioxydante. Ceci est logique dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribuées. L'activité est inversement proportionnelle à la CI_{50} .

Le *Chrysanthemum trifurcatum* représente l'extrait le moins actif avec une CI_{50} de l'ordre de 199 $\mu\text{g}/\text{mg}$ c-à-d. 8 à 16 fois moins actif que la vitamine E et la quercétine. L'effet moins important de cet extrait est fort probablement attribué à sa teneur faible en flavonoïdes et en polyphénols (07.23 g/100g équiv. Pyrogallol).

En comparaison avec les antioxydants standards, les cinq flavonoïdes isolés d'*Asteriscus maritimus* testés séparément s'avèrent mieux actifs comme piègeurs du radical DPPH par rapport à l'extrait brut de la plante. Leur activité antiradicalaire présente des valeurs de CI_{50} importantes et très prometteuses, dont trois ont présenté des valeurs égales ou très proches de la valeur de la quercétine : (CI_{50} =12,1; 13,2 et 13.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) attribuées respectivement aux : 7-O-[6-O-caffeoyl-2-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucoside]-6 méthoxyquercétine ; 7-O-[6-O-caffeoyl-glucoside]-6-méthoxyquercétine et 6-méthoxy-7-O- β -glucoside quercétine.

Les valeurs de ces trois produits sont deux fois plus actives que la vitamine E ayant une valeur de 25 µg/mg.

Le produit 6-méthoxy-7-O-β-[6-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucoside] quercétine présente une valeur de 15.1 µg/mg, proche aussi de la valeur de la quercétine, cette même valeur reste meilleure une fois et demi par rapport à celle de la vitamine E.

Le produit (3-O-β-rutinoside quercétine) présente une valeur de l'ordre de 28,8 µg/mg c.-à-d proche à celle de la vitamine E et moins actif deux fois et demie seulement par rapport à la Quercétine.

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres (R•) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde (FLO•) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH), le FLO• subira par la suite un réarrangement structural permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux Aroxyde [9].

L'efficacité antiradicalaire de nos produits testés est due principalement à la présence des sites potentiels au sein de leurs structures, qui restent nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale et de l'effet scavenger vis-à-vis du radical DPPH. En effet Plusieurs travaux ont montré la mise en évidence de certaines relations entre la structure chimique du flavonoïde et l'activité anti-oxydante et ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable.

Ces éléments structuraux ont été établis par plusieurs auteurs [10, 11, 12], Il s'agit de:

- la présence d'une fonction catéchol sur le cycle B. La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.
- La présence d'un motif énone dans le cycle C.
- La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

- la présence de groupement hydroxyle en position 3.

Amič et collaborateurs en 2003 [13] ont mis en évidence la relation structure-fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'-dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

La présence du groupe hydroxyle 3-OH lié à la double liaison C-2=C-3, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position C-4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité anti-oxydante [14]. Cette activité atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodihydroxyle [15].

- La présence d'un groupe hydroxyle en position 5 peut aussi contribuer à l'effet antioxydant dans le cas des isoflavones [16]
- L'O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes [17, 18]

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante. Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé.

Toutes les propriétés citées précédemment ont conféré probablement à nos produits cette efficacité remarquable d'activité antiradicallaire.

En plus, on note que deux de nos produits les plus efficaces présentent des groupements acyls portés par leurs oses esterifiant la position 7 de la génine, ce qui renforce et explique encore leur efficacité. Il s'agit de :

- 7-O-[6-O-caffeoyl-2-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucoside]-6méthoxyquercétine
- 7-O-[6-O-caffeoyl-glucoside]-6-méthoxyquercétine

En effet, il a été principalement rapporté par Saija et al., [19] que l'acylation de la quercétine sur le groupe hydroxyle en position 3 avec différentes chaînes aliphatiques (acétate, propionate, palmitate) ne masque pas l'activité de piégeage de radicaux libres de la molécule parent.

Mieux encore, Mellou et al., [20] ont observé que les dérivés acylés de la chrysoeriol-7-O-β-D-(3''-E-p-coumaroyl)-glucoside et de la chrysoeriol-7-[6'''-O-acetyl-β-D-allosyl-(1→2)-β-D-glycoside] ont une activité antimicrobienne et antioxydante plus importante que les molécules parents.

L'introduction d'un résidu acyle à un flavonoïde pourrait modifier la conformation de ce dernier. En effet, Figueiredo et al., [21] ont observé des interactions intramoléculaires entre le noyau pyrylium central d'un anthocyane acylée et les deux dérivés cafféyles. De même, la modélisation moléculaire de dérivés glycosylés et acylés (triméthoxybenzoylé) de la quercétine a conduit à des interactions de type Van der Waals et hydrophobiques entre les cycles A et triméthoxybenzoylé pour le dérivé glycosylé de la quercétine [22]. Des interactions similaires entre les cycles aromatiques de la génine et ceux de la partie acyle ont aussi été décrites pour l'ester de la chryisine et de l'acide *p*-méthoxycinnamique (Figure IV.11).

Plusieurs auteurs ont remarqué que l'activité antioxydante était améliorée lorsque la molécule possédait les éléments structuraux cités précédemment et une **planéité** de la molécule. En effet, l'efficacité de l'antioxydant ne dépend pas seulement de la stabilité du radical phénoxy, c'est-à-dire de son nombre de liaisons hydrogènes mais aussi des effets de conjugaison et de résonance.

Ces éléments structuraux et la structure plane conduiraient probablement à la formation d'un radical stable en raison de nombreux groupes phénoliques et d'une délocalisation électronique étendue entre les différents noyaux, une délocalisation importante a été corrélée avec une bonne activité anti-oxydante [23].

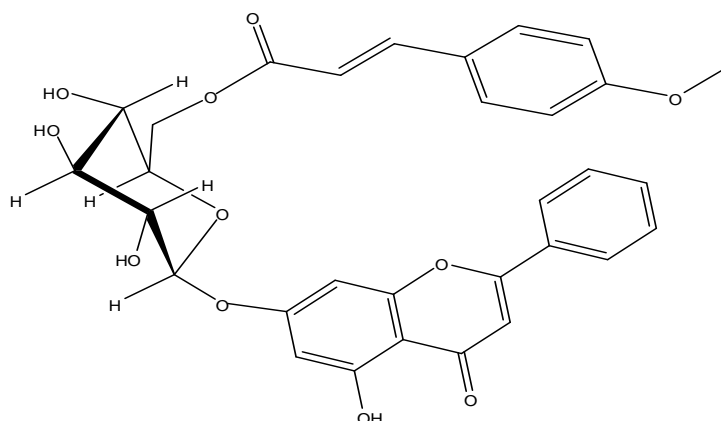


Figure IV.11 : Structure optimisée d'énergie minimale du *p*-méthoxycinnamate de chryisine [9]

Au niveau cellulaire, les groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique [24]. La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leur aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo), (5-hydroxy, 4-oxo) ou orthodihydroxy sur le cycle B (3',4'-OH) (Figure I.6, page 81) [25].

Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison C-2=C-3 qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme Xanthine-oxydase et du radical peroxyde produit par ce dernier [26].

On note, les composés phénoliques agissent généralement comme antioxydants à faible concentration, mais à forte concentration ils peuvent devenir prooxydants par leur autooxydation conduisant à la formation de semiquinone et du radical superoxyde [27, 28].

A la fin, pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait brut de la plante *Asteriscus maritimus* ou de ses flavonoïdes isolés, des études similaires *in vivo* seraient intéressantes et plus prometteuses visant des marqueurs biologiques tels que l'évaluation de la peroxydation lipidique et les enzymes antioxydantes plasmatiques et érythrocytaires. De même, des études approfondies sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces principes actifs seraient utiles pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

Références bibliographiques

- 1-Gao, Z., Huang, K., Yang, X., Xu, H. 1999.** Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem. Biophys. Acta.*,1472: 643-650.
- 2-Ogata, M. Hoshi, M., Urano S., Endo T., 2000.** Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, 48 (10): 1467-1469.
- 3-Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28: 25-30.
- 4-Soares, J.R., Dinis, T.C.P., Cunha, A.P., Almeida, L.M., 1997.** Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis* . *Free rad. Res.*, 26: 469-478.
- 5-Tseng, T.H., Kao, E.S., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, Wu. H.W., Wang, CJ., 1997.** Protective effect of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 35: 1159-1164.
- 6-Kujala, T.S., Lojonen, J.M., Klika, KD., Pihlaja, K., 2000.** Phenolic and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root : distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5338-5342.
- 7-Sanchez-Moreno, C., Satué-Garcia, M.T., Frankel, EN., 2000.** Antioxidant activity of selected spanish wines in corn oil emulsions. *J. Agri. Food Chem.*, 48: 5581-5587.
- 8-Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K. 1997.,** Antioxydant effects of flavonoids. *Biofactors*, 6: 399-402.
- 9-Javanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.J., 1994.** Flavonoids as antioxidants. *J. of the American Chemical Society*. 116: 4846-4851.
- 10- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D.j., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F. Bast, A., 1996.** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* . 20, (3): 331-342.
- 11- Sroka, Z., 2005.** Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C* 60, (11-12): 833-843.
- 12-Aliaga, C., Lissi, A. E., 2004.** Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Can. J. Chem.* 82: 1668-1673.
- 13- Amič, D., Davidović-Amić, D., Beslo, D., Trinajstić, N., 2003.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. 76: 55-61.
- 14- Hahida, F., Wanasundara, P.K.J.P.D., 1992.** Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32 (1): 67-103.

- 15- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996.** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.
- 16- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. of Nutrit. Biochem.* 13, (10): 572-584.
- 17- Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1998.** Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Biochem. Pharmacol.* 56 (2): 213-222.
- 18- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997.** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22: 749-760.
- 19- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Luisa Pellegrino, M., Tita, B., Messina, C., Bonina, F. P., Rocco, C., Nicolosi, G., Castelli, F., 2003.** *In vitro* antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters. *European J. of Pharm. and Biopharm.*, 56, (2): 167-174.
- 20- Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A. D., Kolisis, F. N., Stamatis, H., 2005.** Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J. of Biotech.*, 116, (3): 295-304.
- 21- Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, L., Dangles, O., Brouillard, R., 1996.** New aspects of anthocyanin complexation intramolecular copigmentation as a means for colour loss *Phytochemistry*, 41 (1): 301-308.
- 22- Alluis, B., 2000.** Modifications chimiques de flavonoïdes, étude de leurs pouvoirs complexant (protéines, métaux, pigments) et antioxydants. Université Claude Bernard Lyon I, Lyon.
- 23- Leopoldini, M. P., I. P.; Russo, N.; Toscano, M., 2004.** Structure, Conformation, and Electronic Properties of Apigenin, Luteolin, and Taxifolin Antioxidants. A First Principle Theoretical Study. *J. Phys. Chem. A.* 108 (1): 92-96.
- 24- Cook, N.C., Samman, S. 1996.** Flavonoids Chemistry, Metabolism, Cardioprotectives effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.* , Vol .7.
- 25- Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. 1996.** Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 331-342.
- 26- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L.,**

Vlietinck, A.J., Berphe, D.V., 1998. Structure- Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers, *J. Nat. Prod.* 61: 71-76.

27-Mochizuki, M., Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T., 2002. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1569: 35-44.

28-Jayaprakasha, G.K., Patil., B.S. 2007. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chem.* 101: 410-418.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Parmi elles, quatre plantes ont fait l'objet de notre étude phytochimique et des activités biologiques.

A partir des résultats de l'analyse chimique des deux huiles par GC et GC-MS, on a pu mettre en évidence une variabilité au niveau de la composition chimique, donnant naissance à deux chimiotypes à deux chymotypes différents (*Eucalyptus globulus* à cinéole et *Smyrniium olustratum* à sabinène).

20 composés, représentant 98,3% de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de 1,8-cinéole (48,6%), α -pinène (9,7%) globulol (10,9 %), trans-pinocarvéol (10,7 %) et α -terpinéol (6,6%).

Ces composés ont déjà été identifiés comme constituants des HE d'*Eucalyptus*.

La prédominance du monoxyde terpénique 1,8-cinéole est en accord avec les résultats obtenus pour les huiles du même genre (à cinéole).

33 composés, représentant 94,3% de l'huile essentielle de *Smyrniium olastratum* ont été identifiés. Cette huile est majoritairement composée de sabinène (27.1%), curzerène (13.7%), methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane (12.3%), α -pinène (7.2%), cryptone (7.1%) et β -pinène (5.7%).

Il apparaît que notre huile étudiée est différente de celles décrites dans la littérature, trois composés seulement (curzerène, α -pinène et β -pinène) ont déjà été identifiés comme constituants des HE de *Smyrniium*, les composants restants (sabinène, methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane et cryptone) caractérisent exclusivement notre huile.

L'activité antimicrobienne, a été évaluée en utilisant une gamme de microorganismes afin de donner une idée sur l'étendu du champ d'activité antimicrobienne de nos huiles.

Les essais de criblage du pouvoir antimicrobien, les CMI et les CMD ont été réalisés par la méthode de diffusion sur gel. D'après les résultats obtenus, l'HE d'*E. globulus* semble jouir d'une activité inhibitrice particulièrement large sur les différentes classes de microorganismes testés.

Par comparaison avec l'huile d'*E. globulus*, l'huile de *S. olustratum* apparaît moins active. En effet, quatre bactéries sur dix sont résistantes à cette huile.

La variabilité quant à la sensibilité des microorganismes à l'action des différents types d'essences, serait liée donc à la nature chimique de leurs composants majoritaires.

Les résultats montrent aussi une sensibilité notable des bactéries à Gram positif par rapport aux souches à Gram négatif et ce dans les deux chimiotypes, Cette différence de sensibilité des microorganismes renseigne sur un éventuel effet membranaire de ces essences.

La mise en place de techniques chromatographiques classiques de fractionnement et les techniques spectroscopiques, U.V.et RMN des extraits des parties aériennes des deux plantes ont conduit à l'isolement et l'identification de 11 produits purs, dont 6 sont isolés à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle de *C. trifurcatum* (Apigénine, quercétine, acide caféique, 7-O- β -glucosylapigénine, 7-O- β - glucosyllutéoline et lutéoline).

Les Cinq produits restants sont des flavonoïdes isolés à partir d'*Asteriscus maritimus* :

- 7-O-[6-O-caffeoyl-2-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucoside]-6 méthoxyquercétine
- 6-méthoxy-7-O- β -[6-O-(3-hydroxy-2méthylpropanoyl) glucoside] quercétine
- 7-O-[6-O-caffeoyl-glucoside]-6-méthoxyquercétine
- 6-méthoxy-7-O- β -glucoside quercétine
- 3-O- β -rutinoside quercétine

Le potentiel antiradicalaire des deux extraits et des flavonoïdes isolés a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que l'extrait butanolique d'*Asteriscus* est de loin le plus actif par rapport à l'extrait d'acétate d'éthyle de *Chrysanthemum*.

Les cinq flavonoïdes isolés possèdent une excellente activité, donc ces molécules sont considérées comme des agents antioxydants de première classe comparés à des molécules de référence comme la quercétine et la vitamine E. Ils peuvent être donc employés pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace dans la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Les investigations réalisées pour les quatre plantes sont une première étape qui s'inscrit dans le cadre de leur valorisation, pour développer cet axe de recherche, un certain nombre de perspectives peuvent être envisagées :

- Du point de vue phytochimique, il nous semblerait pertinent, d'étendre nos investigations à l'identification et la purification d'autres métabolites secondaires, appartenant à des classes différentes comme les coumarines et les terpénoïdes potentiellement intéressants pour le traitement de plusieurs pathologies entre autres le cancer.

- Du point de vue activité antioxydante, ce travail ouvre donc un large champ pour l'étude de la plante *Asteriscus maritimus* dont la composition chimique et les activités biologiques n'avaient jusqu'à présent jamais été étudiées.

Nos résultats sur l'activité antioxydante seront complétés par la méthode de modélisation moléculaire d'une manière plus exhaustive pour confirmer l'existence de corrélations entre structure et activité de nos flavonoïdes du moment que ces résultats sont les premiers à identifier les flavonoïdes de cette espèce et leur capacité à piéger les radicaux libres.

-Compléter cette étude par une exploration de l'activité anticytotoxique de l'extrait butanolique de la plante et même de ses flavonoïdes purs isolés sur des cellules cancéreuses du moment que cette analyse est en accord avec des travaux de la littérature suggérant que les sites potentiels de ces flavonoïdes responsables de l'activité antioxydante pourraient éventuellement être le siège d'une activité anticytotoxique.

-Il sera intéressant aussi de vérifier que l'activité antioxydante de nos produits actifs isolés se confirme dans un système plus biologique, après leur métabolisation par la cellule.

Pour cela, nous allons étudier l'effet cytoprotecteur de ces produits sur des cellules en culture soumises à un stress oxydant de type rayonnement U.V.

-Réalisation d'une étude *in vivo* sur un modèle animal.

- A la fin, du fait que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, on propose aussi d'orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires des activités biologiques des plantes (HE, composés polyphénoliques et flavonoïdes) en général et ouvrir des pistes dans la compréhension de la relation structure-activité en particulier, afin de déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

GC/MS Analysis and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Fresh Leaves of *Eucalyptus globulus*, and Leaves and Stems of *Smyrniium olusatrum* from Constantine (Algeria)

Habiba Daroui-Mokaddem^a, Ahmed Kabouche^a, Mabrouka Bouacha^b, Boudjema Soumati^b, Aida El-Azzouny^c, Christian Bruneau^d and Zahia Kabouche^{a*}

^aLaboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (L.O.S.T), faculté des sciences, Université Mentouri - Constantine, Campus Chaabat Ersas, 25000 Constantine, Algeria

^bLaboratoire de Biochimie Appliquée Université Badji-Mokhtar, Annaba, Algeria

^cDivision of Pharmaceutical Industries, National Research Center, Tahrir Street, Dokki, 12622 Cairo, Egypt

^dUMR 6226-CNRS-Université de Rennes1 Sciences Chimiques de Rennes Campus de Beaulieu Avenue du général Leclerc 35000 Rennes cedex, France

zkabouche@yahoo.com

Received: May 7th, 2010; Accepted: August 10th, 2010

The essential oils of fresh leaves of *Eucalyptus globulus* L. (Myrtaceae), and leaves and stems of *Smyrniium olusatrum* L. (Apiaceae), obtained by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus, were analyzed by GC/MS. Twenty compounds were characterized, representing 98.3% of the essential oil of *E. globulus*, with 1,8-cineole (48.6%), globulol (10.9%), *trans*-pinocarveol (10.7%), and α -terpineol (6.6%) as main components, while thirty-three compounds were characterized, representing 94.3% of the essential oil of *S. olusatrum*, with sabinene (27.1%), curzerene (13.7%), methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane carboxylate (12.3%), α -pinene (7.2%), cryptone (7.1%) and β -pinene (5.7%) as the major components. The essential oils of *E. globulus* and *S. olusatrum* were tested against a wide range of fungal and bacterial strains. Both oils showed significant antimicrobial activity.

Keywords: *Eucalyptus globulus*, Myrtaceae, *Smyrniium olusatrum*, Apiaceae, essential oil, 1,8-cineole, *trans*-pinocarveol, globulol, sabinene, curzerene.

Essential oils from many *Eucalyptus* species (Myrtaceae) are used in Algerian folk medicine as analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic remedies for the symptoms of respiratory infections, such as cold, influenza, and sinus congestion. Essential oils of *Eucalyptus* are widely used in modern cosmetics, and in the food, perfumery and pharmaceutical industries [1] besides their biological activities, including antimicrobial and fungicidal [2-4]. *E. globulus* is one of the most used species in Algerian folk medicine [5]. Its essential oil is characterized by a high 1,8-cineole content and has pharmaceutical and industrial applications [6,7]. To the best of our best knowledge, the essential oil of fresh leaves of *E. globulus* has not been reported until now.

Smyrniium olusatrum L. (Apiaceae) is a biennial plant growing in coastal areas of the British Isles and the Mediterranean, extending to the Caucasus and the

Canary Islands. The young shoots of *S. olusatrum* are cultivated and used as a pot herb and edible salad in some areas in Libya. The plant is also used as an antiscorbutic in Palestine [8]. The genus *Smyrniium* is not well documented, but *S. perfoliatum* has been more investigated than the other species [9-11].

The aim of this study was to analyze the hydrodistilled essential oils of the fresh leaves of *E. globulus* and the fresh leaves and stems of *S. olusatrum* collected from Constantine (Eastern Algeria) [12] and to investigate their antimicrobial activity.

The hydrodistillation, in a Clevenger-type apparatus, of fresh leaves of *E. globulus* yielded 2.5% of a yellowish oil, which was analyzed by GC/MS. Twenty components were identified representing 98.3% of the essential oil, mainly characterized by 1,8-cineole (48.6%), globulol (10.9%), *trans*-pinocarveol (10.7%),

Table 1: Chemical compositions of *Eucalyptus globulus* essential oil.

RI ^a	Compound	%
930	α -Pinene	9.7
1030	1,8-Cineole	48.6
1100	Isoamisovalerol	1.1
1151	<i>trans</i> -Pinocarveol	10.7
1165	Pinocarvone	1.0
1178	Terpin-4-ol	0.3
1192	α -Terpineol	6.6
1220	<i>trans</i> -carveol	0.8
1286	Carvacrol	0.1
1327	α -Terpinyl acetate	0.3
1389	Geranyl acetate	0.1
1435	Aromadendrene	4.6
1480	Ledene	0.6
1532	Viridiflorol	0.4
1593	Globulol	10.9
1646	α -Eudesmol	0.8
1655	Jurifer Camphor	0.6
1695	Isoaromadendrene oxide	0.2
1742	6,6-Dimethyl-2-(3-oxobutyl)-bicyclo[3.1.1]heptan-3-one	0.2
1770	Carboxamide	0.7

^aRI = retention indices as determined on DB-5MS column using homologous series of *n*-alkanes.

Table 2: Chemical compositions of *Smyrniolum olusatrum* essential oil.

RI ^a	Compound	%
930	α -Pinene	7.2
979	Sabinene	27.1
985	β -Pinene	5.7
1031	Limonene	0.4
1089	α -Terpinolene	0.5
1100	Linalool	0.6
1120	Octenyl acetate	0.3
1186	Cryptone	7.1
1192	α -Terpineol	0.3
1199	<i>p</i> -Cymen-8-ol	0.3
1248	Cumin aldehyde	0.9
1284	Phellandral	2.1
1295	2-Caren-10-al	0.3
1330	Citronellyl acetate	0.1
1389	Geranyl acetate	0.1
1400	Geosmin	0.2
1420	γ -Elemene	1.0
1490	Curzerene	13.7
1511	γ -Cadinene	0.3
1524	δ -Cadinene	0.6
1541	1,5-epoxysalvial-4(14)-ene	0.4
1585	Caryophyllene oxide	0.4
1600	β -Elemenone	0.6
1605	β -Guaiene	0.8
1618	T-Cadinol	0.1
1643	δ -Cadinol	1.5
1654	α -Cadinol	0.5
1683	Germacrene	0.9
1695	Isoaromadendrene oxide	1.7
1706	2,4-dicyclohexylbuten-3-yne	2.0
1775	Furoscrobiculin B	3.2
1910	Methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane Carboxylate	12.3
2300	Tricosane	2.7

^aRI = retention indices, as determined on a DB-5MS column using a homologous series of *n*-alkanes.

and α -terpineol (6.6%). In previous reports concerning the dried aerial parts of different *Eucalyptus* species, *trans*-pinocarveol was found in lower percentages (lower than 3%). 1,8-Cineole was the major component of the reported *E. globulus* essential oils from dried leaves and fruits (11.7- 71.3%), along with globulol (3-5.2%) and α -pinene (3.6-14%) [13-18] (Table 1).

Hydrodistillation of fresh leaves and stems of *S. olusatrum* yielded 1.2% of a yellowish oil. Thirty-three components were identified, representing 94.3% of the essential oil, mainly characterized by sabinene (27.1%), curzerene (13.7%), methyl-1-benzyl-2-oxocyclooctane carboxylate (12.3%), α -pinene (7.2%), cryptone (7.1%) and β -pinene (5.7%) (Table 2). It appears that the composition of our oil is quite different from that of the previously reported Italian [19] and English [20] essential oils of fresh roots, stems and leaves, mainly represented by furanodiene (8-17%), germacrene B (7-14%) and germacrene (7-8%), besides curzerene.

The antimicrobial results of *E. globulus* and *S. olusatrum* essential oils against selected fungal and bacterial strains are reported in Table 3. Differently from *S. olusatrum* essential oil, which inhibited the growth of *A. niger* strain (18 mm), *E. globulus* essential oil did not exhibit any fungicidal activity against this strain. The best antimicrobial activity of *E. globulus* essential oil was observed against *B. rhuriniensis* (32 mm), *E. coli* (20 mm) and *P. aeruginosa* (20 mm), while *S. olusatrum* essential oil exhibited the highest antimicrobial activity against *B. rhuriniensis* (25 mm) and *S. aureus* ATCC 25923 (25 mm).

Table 2: Antimicrobial activity of *Eucalyptus globules* and *Smyrniolum olusatrum* essential oils.

Microorganism	Diameter of inhibition (mm) (1mg /mL)	
	<i>Eucalyptus</i> oil	<i>Smyrniolum</i> oil
<i>Citrobacter freundii</i>	12	ni
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	ni
<i>Escherichia coli</i>	20	ni
<i>Proteus mirabilis</i>	18	ni
<i>Providencia alcalifaciens</i>	12	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20	20
<i>Bacillus rhuriniensis</i>	32	25
<i>Bacillus subtilis</i>	ni	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16	25
<i>Aspergillus niger</i>	ni	18
<i>Candida albicans</i>	15	15
<i>Penicillium chrysogenum</i>	18	12

ni: no inhibition;

Experimental

Plant material: *E. globulus* L. and *S. olusatrum* L. were collected in May 2006 at Constantine, Algeria by Mr Kamel Kabouche and authenticated by Prof. Gérard De Belair (Annaba University, Algeria). Voucher

specimens (ZKLOST Eg05/06 and ZKLOST So05/06)) were deposited at the herbarium of the Laboratory of Therapeutic Substances (LOST), Faculty of Sciences, Mentouri-University, Constantine, Algeria.

Oil extraction: Hydrodistillation of 200 g of fresh leaves of *E. globulus* and *S. olusatrum*, respectively, for 3 h using a Clevenger-type apparatus, according to the British Pharmacopoeia [21], yielded 2.5% and 1.2%, respectively (w/w) of pleasant-smelling, yellowish oils, which were dried over anhydrous sodium sulfate and then stored at +4°C, until tested and analyzed.

GC analysis: GC analyses were performed using a Finnigan SSQ 7000 mass selective detector equipped with a fused silica (5% methylphenylpolysiloxane DB-5) capillary column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm). Operating conditions were as follows: carrier gas, He with a flow rate of 1 mL/min; column temperature, 40–250°C at 3°C/min; injector and detector temperatures, 280°C; volume injected, 0.1 mL; split ratio, 1:10.

Gas chromatography-mass spectrometry: The oils were analyzed by GC/MS using a Finnigan SSQ 7000 mass selective detector coupled with a Thermo Trace GC 2000, equipped with a fused silica (5% methylphenylpolysiloxane DB-5) capillary column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm). Operating conditions were the same as for the analytical GC. The MS operating parameters were as follows: ionization potential, 70 eV; ionization current, 2 A; ion source temperature, 200°C; resolution, 1000; scan time, 5 s; scan mass range, 40–400 u; split ratio, 1:10. Identification of components in the oil was based on retention indices relative to *n*-alkanes and computer

match. Identification of components in the oils was based on retention indices relative to *n*-alkanes and computer matching with the WILEY 275.L library, as well as by comparison of the fragmentation patterns of the mass spectra with those reported in the literature [22–24]. Quantitative data were obtained from GC-FID area percentages without the use of correction factors.

Determination of antimicrobial activity: The essential oils were tested against a panel of fungal strains, namely, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Penicillium chrysogenum*, and against bacterial strains of *Bacillus rhuriniensis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Providencia alcalifaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The referenced strains were obtained from the Pasteur Institute (Algiers), and the others from the laboratory of bacteriology (clinical isolation).

Susceptibility of the strains to the essential oils was investigated using the disk diffusion method and by comparing their inhibition zones to those reported by NCCLS [25]. Disks containing freshly prepared essential oils were used for antibacterial activity assays. The diameters of inhibition zones were measured and compared with those suggested by NCCLS (sensitive ≥ 15 mm). After incubation at 37°C for 18–24h, the inhibition zones were measured and averaged. The assays were performed in triplicate.

Acknowledgements - The authors are grateful to the MESRS, DRSDT (Ministry of Scientific Research, Algeria) for financial support, and to Mr Abdelhak from the NRC (Cairo, Egypt) for his technical help.

References

- [1] Gomes-Carneiro MR, I. Felzenszwalb I, Paumgarten FJ. (1998) Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*, **416**, 129-136.
- [2] Trigg JK. (1996) Evaluation of a *Eucalyptus*-based repellent against *Anopheles* spp. in Tanzania. *Journal of American Mosquito Control*, **12**, 243-246.
- [3] Cockcroft A, Cosgrove B, Wood RJ. (1998) Comparative repellency of commercial formulations of deet, permethrin and citronellal against the mosquito *Aedes aegypti* using a collagen membrane technique compared with human arm tests. *Medical Veterinary and Entomology*, **12**, 289-294.
- [4] Juergens UR, Stober M, Vetter H. (1998) Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. *European Journal of Medical Research*, **3**, 508-510.
- [5] Bellakhdar J. (1997) Pharmacopée marocaine, Ibisspress, France.
- [6] Skaltasa HD, Mavrommati A, Constantinidis T. (2001) A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys* subsect. Swainsonianae. *Phytochemistry*, **57**, 235–244.
- [7] Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, JYu JJ, Chen WJ, Chang ST. (2009) Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Bioresource Technology*, **100**, 452–456.
- [8] Jafri SMH, El-Gadi A. (1985) *Flora of Libya*, vol. 117. Al Faatheh University, Faculty of Science Publication, Tripoli.
- [9] Tirillini BB, Stoppini AM. (1996) The essential oil composition of fruits from *Smyrniolum perfoliatum*. *Journal of Essential Oil Research*, **8**, 611-614.

- [10] Molleken U, Sinnwell V, Kubeczka KH. (1996) Essential oil composition of *Smyrniium olusatrum*. *Phytochemistry*, **49**, 1709-1714.
- [11] *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana* (1991), IX ed. Istituto Poligrafico Zecca dello Stato, Rome.
- [12] Quezel P, Santa S. (1963) *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*. C.N.R.S., Paris, France.
- [13] Silvestre Armando JD, Cavaleiro José AS, Delmond B, Filliatre C, Bourgeois G. (1997) Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products*, **6**, 27-33.
- [14] Silvestre Armando JD, Cavaleiro José AS, Delmond B, Filliatre C, Bourgeois G. (1994) The essential oil of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal*, **9**, 51-53.
- [15] Pereira SI, Freire Carmen SR, Neto CP, Silvestre Armando JD, Silva Artur MS. (2005) Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal. *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 407-409.
- [16] Bignell CM, Dunlop PJ, Brophy JJ, Jackson JF. (1996) Volatile leaf oils of some south-western and southern Australian species of the genus *Eucalyptus*. Part XII. A. Subgenus *Eudesmia*: B. Subgenus *Symphyomyrtus*: (a) Section *Exsertaria*; (b) Series *Globulares*. *Flavour and Fragrance Journal*, **11**, 145-151.
- [17] Benayache S, Benayache F, Benayahia S, Chalchat JC, Gary RP. (2001) Leaf oils of some *Eucalyptus* species growing in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **13**, 210-213.
- [18] Raho Ghalem B, Mohamed B. (2008) Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2**, 211-215.
- [19] Molleken U, Sinnwell V, Kubeczka KH. (1998) The essential oil composition of fruits from *Smyrniium perfoliatum*. *Phytochemistry*, **47**, 1079-1083
- [20] Bertoli A, Pistelli L, Morelli I, Fraternali D, Giamperi L, Ricci D. (2004) Volatile constituents of different parts (roots, stems and leaves) of *Smyrniium olusatrum* L. *Flavour and Fragrance Journal*, **19**, 522-525.
- [21] *British Pharmacopoeia* (1998) **2**, A-137-A138, HMSO, London, UK.
- [22] Adams RP. (2007) *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry*, 4th Ed., Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
- [23] McLafferty FW, Stauffer DB. (1991) *The important peak index of the registry of mass spectral data*. John Wiley & Son, New York.
- [24] Swigar AA, Silverstein RM. (1981) *Monoterpenes-infrared, mass, proton-NMR, carbon-NMR spectra and Kovats Indices*. Aldrich Chemical Company Inc., Madison.
- [25] National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS (1990) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Villanova, PA: Approved Standard M7-A2.