



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

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**DOCTORAT EN SCIENCES**

Spécialité: Chimie Organique

Par :

**Mr DJELLOULI Mohammed**

Sur le thème

---

## **VALORISATION PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE QUELQUE PLANTES DE SUD OUEST ALGERIEN**

---

Soutenu publiquement le 20/05/2017 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Harek Yahia	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr MOUSSAOUI Abdallah	Professeur	Université de Béchar	Directeur de thèse
Mr BENMEHDI Houcine	Maître de Conférence	Université de Béchar	Co-Directeur de thèse
Mr MEDDAH Boumédiène	Professeur	Université de Mascara	Examineur
Mr LAZOUNI Hamadi A/Rahmane	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr SELLES Chaouki	Maître de Conférence	Université de Tlemcen	Examineur

***LABORATOIRE DE VALORISATION DES RESSOURCES VEGETALES  
ET SECURITE SANITAIRE DANS LES ZONES SEMI-ARIDES (VRVSA)-BECHAR***

# *Dédicaces*

*A la mémoire de ma grand-mère*

*A mes parents que Dieu les garde.*

*A ma chère femme et mes chers enfants Hicham Charef Iddine, Nihal*

*Hibat Allah et Firas Salah Eddine.*

*A tous les hommes courageux qui ont perdu leurs vies pour qu'on puisse*

*vivre en paix et en liberté.*

# Remerciements

*Avant tout, je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.*

*Le travail faisant l'objet de cette thèse a été réalisé au laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans les zones semi-arides, au sud-ouest de l'Algérie, Université Tahri Mohamed Béchar, sous les orientations de son directeur Pr : **A. MOUSSAOUI**. Je lui exprime ici mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance d'avoir accepté de m'encadrer, pour l'inlassable soutien qu'il m'a accordé, pour la facilité de travail qu'il m'a procurée et pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de mon travail.*

*Je suis infiniment reconnaissant à mon co-encadreur Dr : **H. BENMEHDI**, Maître de Conférences chargé de cours à l'Universitaire Tahri Mohammed de Béchar, pour le soutien qu'il m'a accordé. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour vos qualités scientifiques et humaines.*

*Je remercie très vivement Monsieur **Y. HAREK**, Professeur à l'université Aboubekr Belkayed de Tlemcen d'avoir accepté de me faire l'honneur d'assurer la présidence du jury de ma thèse de doctorat. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.*

*Mes vifs remerciements vont également aux membres de jury Monsieur **H.A. LAZOUNI**, Professeur à l'Université Aboubekr Belkayed de Tlemcen, Monsieur **C. SELLES** Maître de Conférence à l'Université Aboubekr Belkayed de Tlemcen et à Monsieur **B. MEDDAH** Professeur à l'Université de Mascara, pour le grand honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner et de juger mon manuscrit de thèse, malgré leurs nombreuses responsabilités scientifiques, qu'ils me permettent d'ajouter qu'on plus de cet honneur, leurs présence donne à mes yeux une valeur ajoutée à mon modeste travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde et respectueuse reconnaissance.*

*Je tiens à remercier tous mes collègues du Laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans les zones semi-arides, au sud-ouest de l'Algérie, Université Tahri Mohamed Béchar, spécialement Madame **MOUSSAOUI N.N. BOUDARBA**, Maître assistant chargé de cours à université Tahri mohamed de Bechar, pour son aide précieuse durant l'évaluation biologique de mes huiles essentielles et mes collègues*

et frères **L. ZIANE** et **N. HAMIDI** et **A. NASRI** pour leur gentillesse, leur humour et les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Enfin, je remercie ma famille spécialement mon père d'avoir tout sacrifié pour mes études, ma femme et mes enfants d'avoir pu me supporter et me laisser dans mon monde de rêves scientifiques derrière mon pc, et mes frères et sœurs pour la joie quotidienne qu'ils m'apportent tout au long de mon travail.

**Mr : Mohammed DJELLOULI**

## ملخص

في اطار التقييم الكيميائي و البيولوجي للنباتات الطبية للجنوب الغربي الجزائري, كان هدف هذا البحث دراسة التركيبية الكيميائية و الفعالية البيولوجية للزيوت الطيارة المستخلصة من نبتتين طبيتين : *Cotula cineria* و *Warionia saharae* كثيرتا الاستخدام في الاستطباب الشعبي لأبناء المنطقة.

بعد استخلاص الزيوت من المنطقة العلوية للنباتين عن طريق التقطير, تم تحديد مكونات هذه الزيوت باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا في الحالة الغازية المصاحبة لمطيافية الكتلة (CPG/SM) كما تمت دراسة حساسية الميكروبات باستخدام طريقة الانتشار لفانسون وطريقة التخفيف في الوسط السائل.

التحليل الكيميائي لزيت نبتة *Cotula cineria* كشف عن 33 مكون كيميائي من بينها (E)-citral (24.01%), Limonene epoxide cis- (18.26%), Carvacrol, Thymol methyl ether (15.04%), Carvone (3.06%), Trans-carveol (13.79%), و Trans-piperitol (2.54%) كمكونات أساسية سائدة لهذا الزيت.

اما التحليل الكيميائي لزيت نبتة *Warionia saharae* فقد كشف عن 37 مكون كيميائي, المكونات الاساسية السائدة كانت:  $\beta$ -Guaiene (32.89%),  $\beta$ -Eudesmol (17.45%), Allo-4-Terpineol (15.69%), Cis- (5.84%), Ocimene (5.38%), linalyl acetate (5.14%), Camphor (5.14%), و Citronellol (4.09%) و Limonene epoxide (3.54%).

أظهر اختبار النشاط الميكروبي لزيت نبتة الكوتولا سنيريا ان له فعالية معتبرة على معظم الميكروبات (ليستيريا مونوسيتوجينس, بنيسيليوم اكسانسوم, ستافيلوكوك اورييوس, اسبيرجيليس اوكتاريس, سالمونلا تيفي, اشيرشيا كولي و بسودوموناس ايروجينوزا) و فعالية متوسطة ضد الفطريات (اسبيرجيليس نيجر و اسبيرجيليس فلافيس). أما زيت نبتة الواريونيا صحارا فقد اظهر فعالية كبيرة على جميع الفطريات التي استخدمت في التجربة (اسبيرجيليس اوكتاريس, اسبيرجيليس نيجر, اسبيرجيليس فلافيس و بنيسيليوم اكسانسوم).

## الكلمات المفتاحية

كوتولا سنيريا, واريونيا صحارا, الزيوت الطيارة, الفعالية البيولوجية.

---

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation phytochimique et biologique des plantes médicinales du sud-ouest Algérien, Le présent travail a pour objectif l'étude de la composition chimique et l'activité biologique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques *Cotula cineria* et *Warionia saharae*, largement utilisés en pharmacopée traditionnelle de la région.

L'extraction est effectuée par hydrodistillation. L'analyse des huiles essentielles est réalisée par CPG/SM. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et la méthode des dilutions.

L'analyse chimique de *Cotula cinerea* a révélé la présence de 33 constituants dominés par (E)-citral (24.01%), Limonene epoxide cis- (18.26%), Thymol methyl ether (15.04%), Carvacrol (15.03%), Trans-carveol (13.79%), Carvone (3.06%) et Trans-piperitol (2.54%).

L'huile essentielle de *Warionia saharae* est constituée principalement de 37 constituants dont les constituants majoritaires :  $\beta$ -Guaiene (32.89%),  $\beta$ -Eudesmol (17.45%), 4-Terpineol (15.69%), Allo-Ocimene (5.84%), linalyl acetate (5.38%), Camphor (5.14%), le Citronellol (4.09%) et le Cis-Limonene epoxide (3.54%).

L'huile de *Cotula cinerea* a exposé une forte activité contre l'ensemble des souches testées (*Listeria monocytogenes*, *Penicillium expansum*, *Staphylocoque aureus*, *Aspergillus ochratus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et une moyenne activité contre les deux souches fongiques (*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*). L'huile de *Warionia saharae* a exposé une forte activité contre l'ensemble des souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochratus* et *Penicillium expansum*) et une moyenne activité contre l'ensemble des souches bactériennes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylocoque aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*).

**Mots clefs :** *Cotula cinerea*, *warionia saharae*, huiles essentielles, activité biologique.

## **Abstract**

In the framework of the valorization of medicinal plants in the south-west Algeria, The present work has for objective the study of the chemical composition and the biological activity of essential oils extracted by hydrodistillation of two aromatic plants largely used in the traditional pharmacopeia *Cotula cinerea* and *Warionia saharae*, widely used in traditional pharmacopoeia.

The essentials oils were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectroscopy ( GC/MS). 33 and 37 components were identified in the essential oils of *Cotula cinerea* and *Warionia saharae*, respectively. The main constituents of *C. sempervirens* essential oil were (E)-citral (24.01%), Limonene epoxide cis- (18.26%), Thymol methyl ether (15.04%), Carvacrol (15.03%), Trans-carveol (13.79%), Carvone (3.06%) et Trans-piperitol (2.54%). while they were  $\beta$ -Guaiene (32.89%),  $\beta$ -Eudesmol (17.45%), 4-Terpineol (15.69%), Allo-Ocimene (5.84%), linalyl acetate (5.38%), Camphor (5.14%), le Citronellol (4.09%) et le Cis-Limonene epoxide (3.54%) for *Warionia saharae*.

The oil of *Cotula cinerea* has exposed a strong activity against all of the tested strains (*Listeria monocytogenes*, *Penicillium expansum*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus ochratus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and an average activity against the two fungal strains (*Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*). The oil of *Warionia saharae* has exposed a very strong activity against the whole of fungal strains (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochratus* and *Penicillium expansum*) and a low level of activity against the whole of the bacterial strains (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*).

**Kye words :** *Cotula cinerea*, *Warionia saharae*, essential oils and biological activity.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	Glande sécrétrice sur la surface supérieure de la feuille d'Origan vulgaire (Svoboda, 2003).....	10
<b>Figure 02</b>	Structure d'une unité isoprène (Hernandez Ochoa, 2005).....	10
<b>Figure 03</b>	Structures de quelques monoterpènes acycliques .....	12
<b>Figure 04</b>	Structure de quelques monoterpènes monocyclique .....	12
<b>Figure 05</b>	Structure de quelques terpènes bicycliques .....	13
<b>Figure 06</b>	Structure de quelques sesquiterpènes .....	13
<b>Figure 07</b>	Structure de quelques Exemple de composés aromatiques.....	14
<b>Figure 08</b>	Schéma d'un montage d'hydrodistillation.....	16
<b>Figure 09</b>	Schéma d'un montage d'hydrodistillation par entrainement à la vapeur....	16
<b>Figure 10</b>	Schéma d'extraction par la graisse froide.....	18
<b>Figure 11</b>	Montage d'hydro distillation assisté par micro-onde ( <b>Elhaib., 2011</b> ).....	19
<b>Figure 12</b>	Principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles ( <b>Paul Goetz et al., 2012</b> ).....	26
<b>Figure 13</b>	Fleurons ligulés (fleur de pissenlit).....	30
<b>Figure 14</b>	Fleurons tubulés (fleur de <i>Cotula cinerea</i> ).....	30
<b>Figure 15</b>	Fleurons ligulés et tubulés (marguerite).....	31
<b>Figure 16</b>	Fiche d'enquête ethnobotanique.....	33
<b>Figure 17</b>	Situation géographique de la région de Béchar et la ville de Béchar .....	34
<b>Figure 18</b>	La plantes <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	35
<b>Figure 19</b>	Morphologie générale de la plante <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	36
<b>Figure 20</b>	La plantes <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	37
<b>Figure 21</b>	Morphologie générale de la plante <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	37
<b>Figure 22</b>	Organigramme des différentes étapes de notre travail.....	40
<b>Figure 23</b>	Montage hydro distillation.....	43
<b>Figure 24</b>	Principe de la méthode de diffusion par disque ( <b>Guinoiseau., 2010</b> ).....	49

## Liste des figures

---

<b>Figure 25</b>	Méthode de détermination de CMI en milieu liquide ( <b>Guinoiseau ., 2010</b> )	50
<b>Figure 26</b>	Utilisation des deux plantes en fonction du sexe.....	53
<b>Figure 27</b>	Utilisation des deux plantes en fonction de l'Age.....	53
<b>Figure 28</b>	Huile essentielle de la plante <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	57
<b>Figure 29</b>	Huile essentielle de la plante <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	57
<b>Figure 30</b>	Rendements en huiles essentielles extraites des deux plantes étudiées.....	59
<b>Figure 31</b>	Histogramme représentant la teneur des différents Terpénoides dans l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	63
<b>Figure 32</b>	Composés majoritaires de l'huile de <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	64
<b>Figure 33</b>	Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	68
<b>Figure 34</b>	Histogramme représentant la teneur des différentes classes chimique pour l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	69
<b>Figure 35</b>	Composés majoritaires de l'huile de <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	70
<b>Figure 36</b>	La voie biosynthétique proposée du guaianolide lactones sesquiterpéniques.....	72
<b>Figure 37</b>	Structure de quelques epoxy-Guaian-12,5-olides dérivées de Guaiene extraites de la plante <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	73
<b>Figure 38</b>	Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	75
<b>Figure 39</b>	Histogramme représentant les souches et leurs résistances aux antibiotiques testés.....	76
<b>Figure 40</b>	Antibiogramme d' <i>Escherichia Coli</i> (Antibiotiques : TOB, E, PRL, VA et TE).....	77
<b>Figure 41</b>	Effet antimicrobien de l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> (Del) vis-à-vis quelques souches microbiennes testées.....	80
<b>Figure 42</b>	Sensibilité des microorganismes testés à l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	81
<b>Figure 43</b>	Effet antibactérien de l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss)vis-à-vis les quatre souches testées.....	83
<b>Figure 44</b>	Sensibilité des souches testées à l'huile <i>Warionia saharae</i> .....	84

## Liste des tableaux

Tableau 01	Type des composés terpéniques ( <b>Pibiri., 2006</b> ).....	11
Tableau 02	Pouvoir pathogène des souches microbiennes testées.....	39
Tableau 03	Utilisation traditionnelles des deux plantes étudiées selon d'autres études ethnobotaniques dans différents régions.....	55
Tableau 04	Résultats du criblage phytochimique réalisé sur les deux plantes étudiées.....	56
Tableau 05	Rendement en huiles essentielles extraites des deux plantes <i>Cotula cinerea</i> (Del) et <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	58
Tableau 06	Caractéristiques physico-chimiques des deux huiles essentielles étudiées.....	60
Tableau 07	Différentes classes des composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> .....	64
Tableau 08	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> (Del)...	67
Tableau 09	Différentes classes des composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	70
Tableau 10	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i> (Coss & Bent).....	74
Tableau 11	Résultats du test de sensibilité des souches aux antibiotiques.....	76
Tableau 12	Activité antibactérienne des huiles essentielles de la partie aérienne des deux plantes <i>Cotula cinerea</i> (Del) et <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	79
Tableau 13	Pouvoir antibactérien des huiles essentielles de la partie aérienne de la plante <i>Cotula cinerea</i> .....	85

---

# Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	01
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b> .....	05
<b>Chapitre I : Généralité sur les huiles essentielles</b> .....	06
I.1. Bref historique.....	07
I.2. Définition.....	09
I.3. Localisation et répartition.....	09
I.4. Composition chimique des huiles essentielles.....	10
I.4.1. Terpénoïdes.....	10
1.4.1.1. Hémiterpènes.....	11
1.4.1.2. Monoterpènes (composés à C <sub>10</sub> ).....	11
1.4.1.3. Sesquiterpènes (composés à C <sub>15</sub> ).....	13
I.4.2. Composés aromatiques.....	14
I.4.3. Composés d'origines diverses.....	14
I.5. Caractéristiques physico-chimiques et contrôle de qualité des huiles essentielles.....	15
I.5.1. Indices physiques et organoleptiques.....	15
I.5.2. Indices chimiques.....	15
I.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	15
I.6.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	15
I.6.1.1. L'hydrodistillation.....	15
I.6.1.2. Distillation à la vapeur d'eau.....	16
I.6.2. Extraction par les solvants organiques.....	17
I.6.2.1. Extraction par les solvants volatils .....	17
I.6.2.2. Extraction par le Forane 113.....	17
I.6.2.3. Extraction au dioxyde de carbone supercritique.....	17
I.6.2.4. L'enfleurage.....	17
I.6.2.4.1. L'enfleurage à froid.....	18
I.6.2.4.2. L'enfleurage à chaud.....	18
I.6.2.5. L'expression à froid.....	18
I.6.2.6. Distillation assistée par micro-ondes.....	19
I.7. Conservation des huiles essentielles.....	19
I.8. Rôles des huiles essentielles.....	19

---

I.9. Utilisation industrielles des huiles essentielles.....	20
I.9.1. Secteur de parfumerie/ cosmétique.....	20
I.9.2.Secteur de parfumerie technique.....	20
I.9.3. Secteur Alimentaire.....	21
I.9.4. Secteur médecine.....	21
I.10. facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	21
I.11. Activités biologiques des huiles essentielles.....	22
I.11.1. Activité antimicrobienne.....	22
I.11.2. Activité antifongique.....	23
I.11.3. Activité antiparasitaire.....	24
I.11.4. Activité antiviral.....	24
I.11.5. Activité antioxydante.....	24
I.12. Mode d'action des huiles essentielles contre les bactéries.....	25
I.12. Toxicité des huiles essentielles .....	26
<b>Chapitre II : Généralité sur la famille des <i>Asteraceae</i></b> .....	28
II.1. La familles des <i>Asteraceae</i> .....	29
II.1.1. Caractéristiques générales des <i>Asteraceae</i> .....	29
II.1.2. Types de fleurs des <i>Asteraceae</i> .....	29
II.1.3. Utilisations et intérêts économiques des <i>Asteraceae</i> .....	31
<b>Deuxième Partie: Matériels et Méthodes</b> .....	32
II.1. Enquêtes ethnobotanique.....	33
II.1.1. Description de la région d'étude.....	34
II.1. 2. Le climat de la région d'étude.....	34
II.2. Matériels biologiques.....	35
II.2.1. Présentation des plantes étudiées.....	35
II.2.1.1. La plante <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	35
II.2.1.2. La plante <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	37
II.2.1.3. la récolte des plantes étudiées.....	38
II.2.3. la conservation.....	38
II.3. Les souches bactériennes.....	38
II.3. Méthodes.....	39
II.3.1. Criblage phytochimique.....	41
II.3.2. Extraction des huiles essentielles.....	43

II.3.3. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	44
II.3.4. Méthode d'analyse des huiles essentielles.....	46
II.3.5. Étude de l'activité antimicrobienne.....	48
II.3.5.1. Préparation et identification des souches microbiennes.....	48
II.3.5.2. La mise en culture.....	48
II.3.5.3. Évaluation d'activité antimicrobienne.....	48
II.3.5.4. détermination de d'activité par la méthode de diffusion (Méthode de Vincent)..	49
II.3.5.5. La détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.....	51
<b>Partie III : Résultats et Discussion</b> .....	<b>52</b>
III.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique.....	53
III.2. Résultats du criblage phytochimique.....	56
III.3. Résultats de l'extraction des huiles essentielles.....	57
III.3.1. Calcul des rendements.....	58
III.4. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	60
III.4.1. Indices physiques.....	60
III.4.2. Indices chimiques.....	61
III.5. Analyse GC/MS des huiles essentielles.....	62
III.5.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> (Del)	62
III.5.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i> (Bent & Coss).....	69
III.6. Activité antimicrobienne.....	76
III.6.1. Résultats du test de résistances de souches bactériennes testées aux antibiotiques	76
III.6.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles des deux plantes étudiées.....	78
III.6.2.1. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> (Del).....	79
III.6.2.2. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss).....	82
III.5.2. Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide.....	84
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>90</b>
<b>Références bibliographiques</b>	

# *Introduction Générale*

## **Introduction générale**

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces qui appartiennent à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques (**Gaussen et al., 1982**).

La région saharienne du sud-ouest Algérie est dotée d'une biodiversité très riche, avec une avalanche de beaucoup de plantes aromatiques utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable (**Kheyar et al., 2013**).

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une source de substances ayant des vertus thérapeutiques diverses, utilisées depuis l'Antiquité dans la pharmacopée traditionnelle de nombreux pays. Ces extraits volatils ont été utilisés en traitement des maladies infectieuses présentes avant la découverte des micro-organismes (**Buchbauer., 2011**) et des antibiotiques.

La découverte des antibiotiques en 1929 par Alexander Fleming, qui a mis en évidence pour la première fois l'action de la pénicilline, a donné l'espoir que les antibiotiques puissent éradiquer les pathologies causées par les infections, mais l'apparition de la résistance des micro-organismes a fait douter de cette opinion et posé le problème de l'échec de l'antibiothérapie (**Khadir et al., 2013**).

Plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. En effet, durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué (**Iserin., 2001 in Kheyar et al., 2013**).

Les bactéries en sont devenues de plus en plus résistantes. Cette résistance aux antibiotiques est un problème auquel sont confrontés les professionnels de la santé à travers le monde (**Avorn et al., 2001**). La question est d'autant plus complexe lorsqu'il s'agit de résistances portées par des éléments mobiles, facilement transférables (**Atailia et al., 2015**).

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être groupée en trois grands mécanismes : modification de l'antibiotique, modification de la cible et de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (défaut d'accumulation) (**Kheyar et al., 2013**).

Face à cet échec thérapeutique causé par la résistance aux antibiotiques la communauté scientifique est contrainte à chercher d'autres substances douées d'activité antimicrobienne pour remédier à ce problème de santé publique (**Shin et al., 2004**).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. C'est pour cela que l'industrie pharmaceutique se tourne vers la nature et a entrepris une vaste étude sur le terrain pour répertorier les plantes les plus prometteuses parce qu'il est nécessaire aujourd'hui, de valider l'usage traditionnel de ces plantes et d'évaluer scientifiquement leurs activités pharmacologiques retenues (**Bahorun., 1997**).

Les produits naturels parmi lesquels les essences végétales issues de plantes médicinales sont une source prometteuse et un moyen efficace pour l'éradication des germes résistant aux antibiotiques puisqu'elles possèdent un réservoir de molécules anti-infectieuses importantes ayant des propriétés contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Buchbauer., 2011**).

De cela, un intérêt majeur est porté aux plantes aromatiques et médicinales dont les propriétés antimicrobiennes sont dues essentiellement à la fraction d'huile essentielle (**Caillet et al., 2007**).

La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles. Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires (**Amarti et al., 2011**).

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques (comme agents antiseptiques, antibactériens et antifongiques... etc.). En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (**Elhaib., 2011**).

En Algérie en général et à Béchar en particulier, une collaboration entre les chimistes et les biologistes est mise en œuvre pour chercher à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle et leurs modes d'utilisation, leurs indications dans diverses pathologies ainsi que les principes actifs responsables de leurs propriétés pharmacologiques.

Dans ce contexte, ce travail étant purement de caractère chimique et biologique, nous sommes fixé comme objectif principal l'étude de la composition chimique et la valorisation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux plantes endémiques

de la région de sud-ouest Algérien *Cotula cinerea* (Del) et *Warionia saharae* (Bent & Coss).

Notre travail est structuré comme suit :

- La première partie comporte une investigation bibliographique dans laquelle les connaissances liées aux huiles essentielles seront arborées dans un premier chapitre. Dans le second chapitre, nous exposerons une présentation abrégée de la famille des astéracées et des espèces étudiées.
- La deuxième partie s'articule aux matériels et méthodes utilisés dans ce travail. Nous exposerons le matériel utilisé, les méthodes et les conditions opératoires liées à : L'étude ethnobotanique et la région d'étude, le criblage phytochimique, l'extraction par hydrodistillation, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, l'étude de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles étudiées.
- La troisième partie de ce travail est consacré aux résultats et discussion.

*Partie I*

*Synthèse Bibliographique*

*Chapitre I*  
*Généralités sur les huiles*  
*essentielles*

## I.1. Bref historique

Depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments, grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Dans celui-ci, sont produites des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal. Parmi les milliers de molécules produites dans ce métabolisme, l'Homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants microbiens pathogènes (champignons, bactéries ou virus) et de corriger ses troubles métaboliques (**Fouché et al., 2000**).

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**). La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (**Bruneton, 2009**).

Dans les civilisations chinoise, indienne (médecine ayurvédique) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicale, le "Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung", fut rédigé vers 2900 avant J.-C. Vers 4000 ans avant J.-C., les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Egyptiens (**Fouché et al., 2000**).

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5<sup>e</sup> siècle avant J.-C.), utilisaient couramment les narcotiques, les laxatifs ou des émétiques (vomitifs). Théophraste (370-285 avant J.-C.) classe les plantes dans son ouvrage *Historia plantarum*. Quelques siècles plus tard, l'œuvre d'Hippocrate fut élargie par Dioscoride. Il inventoria plus de cinq cents drogues d'origines minérale, végétale ou animale, dans un traité écrit en grec en l'an 77 de notre ère. Il fut traduit en latin au XV<sup>e</sup> siècle, sous le titre de *De materia medica*. Parmi ces drogues, cinquante-quatre figurent toujours parmi la liste des plantes médicinales essentielles, établie en 1978 par l'Organisation Mondiale de la Santé (**Fouché et al., 2000**).

Les musulmans avaient, aussi, leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925), fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit

le "*Canon de la médecine*". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier, jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet "*Somme des Simples*" : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs (**Fouché et al., 2000**).

À cette époque, bien que les huiles essentielles ne soient pas signalées nommément, les plantes aromatiques étaient largement employées (**Bahorun., 1997**). Et leurs huiles essentielles ont tenu une grande place dans la vie quotidienne de ces peuples civilisations. D'abord utilisées à des usages sacrés (rites funéraires, embouement des morts, sacrifices aromatiques aux ancêtres...etc.), mais aussi on retrouve l'utilisation de ces végétaux dans des pratiques thérapeutiques (**Pibiri., 2006**).

Cependant, en ce temps, personne ne connaissait réellement le secret et les propriétés de ces plantes. C'est avec l'évolution de la chimie et autres innovations scientifiques, que les huiles essentielles ont pu être découvertes [4].

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, des chercheurs (Chamberland, Cadéac, Martindale) démontrent, par leurs expérimentations, le pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Cependant, les véritables "pères" de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet. Aujourd'hui, des médecins (Valnet, Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt, Belaiche), des chercheurs (P. Franchomme) et des pharmaciens (D. Baudoux) ont définitivement assis la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des huiles essentielles (**Zhiri et Baudoux., 2005**).

De nos jours, la pharmacologie s'oriente de plus en plus vers des traitements à base de plantes, car l'efficacité de la synthèse chimique a largement atteint ses limites et n'arrive plus à être créative. L'exemple de l'antibiorésistance microbienne, à l'origine de la recrudescence des maladies nosocomiales se passe de tout commentaire (**Iserin., 2001**).

Les plantes médicinales aromatiques sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme model pour les composés pharmacologiquement actifs (**Newman et al, 2002 in Mezouar et al, 2014**).

## I.2. Définition

Les huiles essentielles, ou essences végétales, sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature lipophiles et hydrophobes, totalement solubles dans les alcools, l'éther et dans les huiles végétales et minérales lorsqu'elles sont pures et naturelles, elles ne contiennent aucun corps gras, elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles (**Djellouli., 2008**).

D'après la norme française AFNOR : NF T 75-006 (**octobre 1987**) : l'huile essentielle est « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur (**Lucchesi et al., 2004**), soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche » (**Bruneton., 1993**).

D'après la 8<sup>ème</sup> édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (**Bruneton., 1999**).

## I.3. Localisation et répartition

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal, mais d'après les botanistes 10% seulement des espèces végétales sont dites « aromatiques ».

Ces huiles se retrouvent dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fleurs et fruits) et dans toutes les régions climatiques du globe. Les facteurs environnementaux comme la température, l'irradiance et la photopériode peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle (**Népomuscène., 1995**).

Ces plantes synthétisent et secrètent naturellement des infimes quantités d'essence aromatique par des cellules sécrétrices qui contiennent de la chlorophylle, ces huiles sont élaborées au sein du cytoplasme, ces cellules s'en séparent par synérèse, sous forme de petites gouttelettes qui confluent en suite en plages plus au moins étendues comme le montre Figure 06, transportées et stockées dans tous les organes des végétaux, fleurs (rose, lavande), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelle), des bois (bois de rose, cèdre, santal), des racines (vétiver), fruits (orange) et graines (muscade, anis) (**Pipiri., 2006**).



**Figure 01** : Glande sécrétrice sur la surface supérieure de la feuille d'Origan vulgaire (Svoboda., 2003).

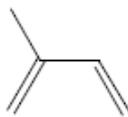
Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre de familles limitées, Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingibaraceae, et Pipiraceae... etc. (Pipiri., 1986).

#### I.4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles volatiles sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des terpénoïdes (monoterpènes et des sesquiterpènes) de formule générale  $(C_5H_8)_n$ . Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes (Djellouli., 2008). On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Svoboda et Hampson., 1999).

##### I.4.1. Terpénoïdes

Ce sont des produits naturels, formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isoprène comme le montre la **Figure 02**.



**Figure 02** : Structure d'une unité isoprène (Hernandez Ochoa ; 2005).

La grande majorité des terpènes est spécifique du règne végétal, mais cette spécificité n'est pas absolue. La synthèse d'une grande variété de terpénoïdes, non cycliques et cycliques, dans les plantes, fait intervenir un nombre variable d'éléments isoprènes. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonées  $(C_5)_n$  ramifié, on peut faire la classification suivante représenté dans le Tableau 1:

**Tableau 01** : Type des composés terpéniques (Pibiri., 2006).

n	C <sub>n</sub>	Type de composé
1	C <sub>5</sub>	Hémiterpènes
2	C <sub>10</sub>	Monoterpènes
3	C <sub>15</sub>	Sesquiterpènes
4	C <sub>20</sub>	Diterpènes
5	C <sub>25</sub>	Sesterpènes
6	C <sub>30</sub>	Triterpènes
8	C <sub>i</sub>	le caoutchouc naturel (polyterpènes)

Dans les terpénoïdes, la tête d'un élément isoprène est ordinairement liée à la queue de l'élément suivant, toutefois, on rencontre des exemples de terpénoïdes où se trouvent des liaisons " tête-tête " et " queue-queue " (Djellouli., 2008).

Dans le cas des huiles essentielles, seuls seront rencontrés les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : les mono et sesqui terpènes (Bruneton., 2009).

#### I.4.1.1. Hémiterpènes

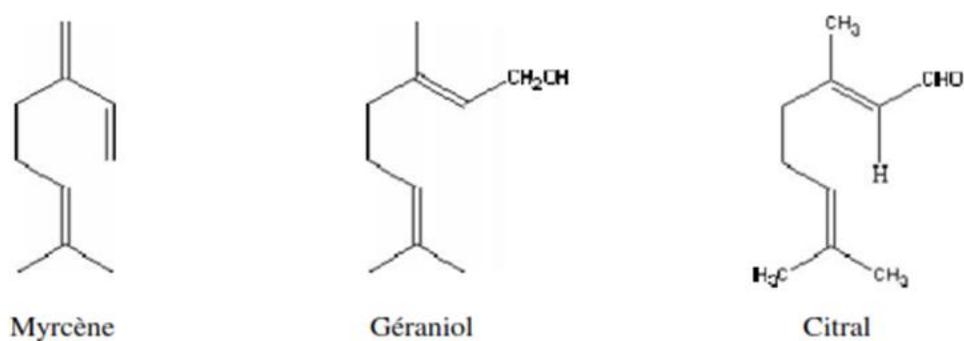
Dans la nature, il existe peu de composés naturels ayant une formule de C<sub>5</sub> ramifiée; parmi certains composés naturels trouvés chez les plantes qui peuvent être considérés comme hémiterpène, seul l'isoprène a toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes (Loomis et Croteau, 1980).

#### I.4.1.2. Monoterpènes (Composés à C<sub>10</sub>)

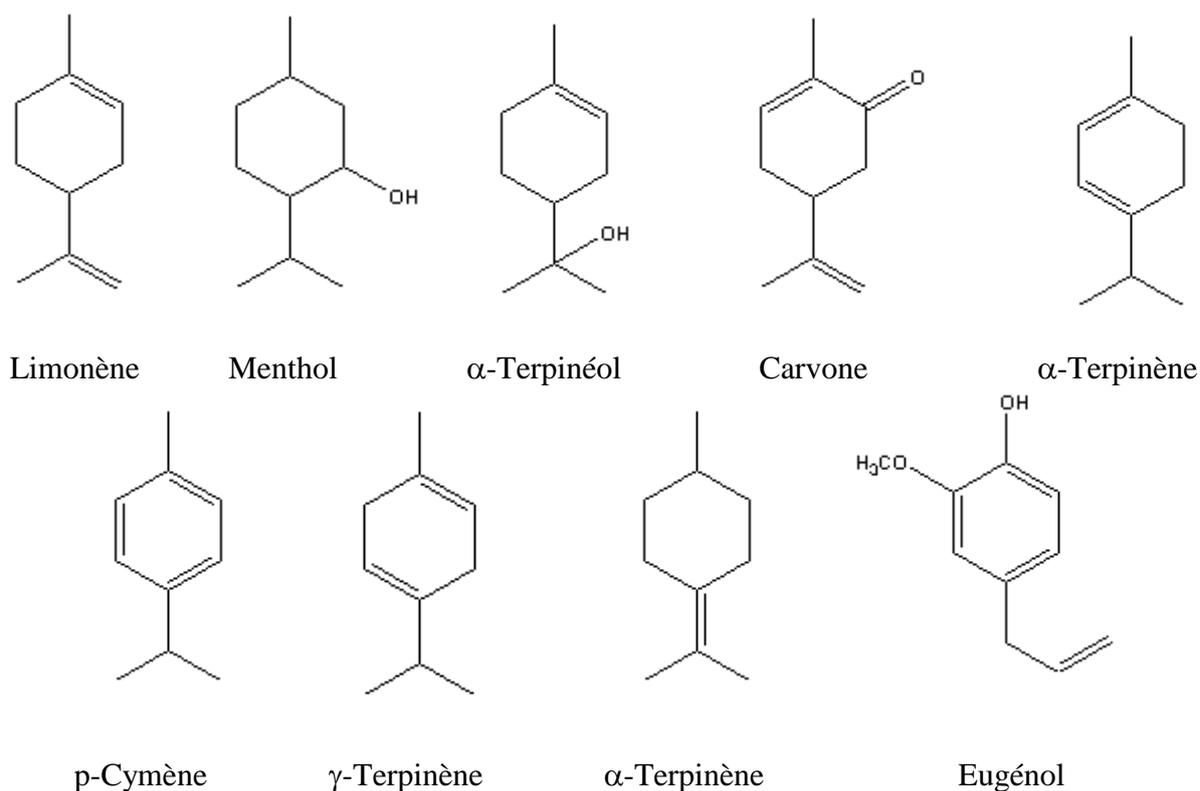
Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>. Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes linéaires acycliques comme le montre la **Figure 03**, les monoterpènes avec un cycle unique monocycliques comme le montre la **Figure 04**, et ceux avec deux cycles (bicycliques) comme le montre la **Figure 05**. Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène (Allen et al., 1977). Selon Malecky (2008), on distingue 4 groupes dans cette catégorie:

- Les hydrocarbures en C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> contenant deux doubles liaisons: D-limonène et les phellandrènes sont les représentants les plus connus de cette famille.
- Les hydrocarbures en C<sub>10</sub>H<sub>18</sub> contenant une double liaison: les terpinéols sont les plus fréquents dans cette famille

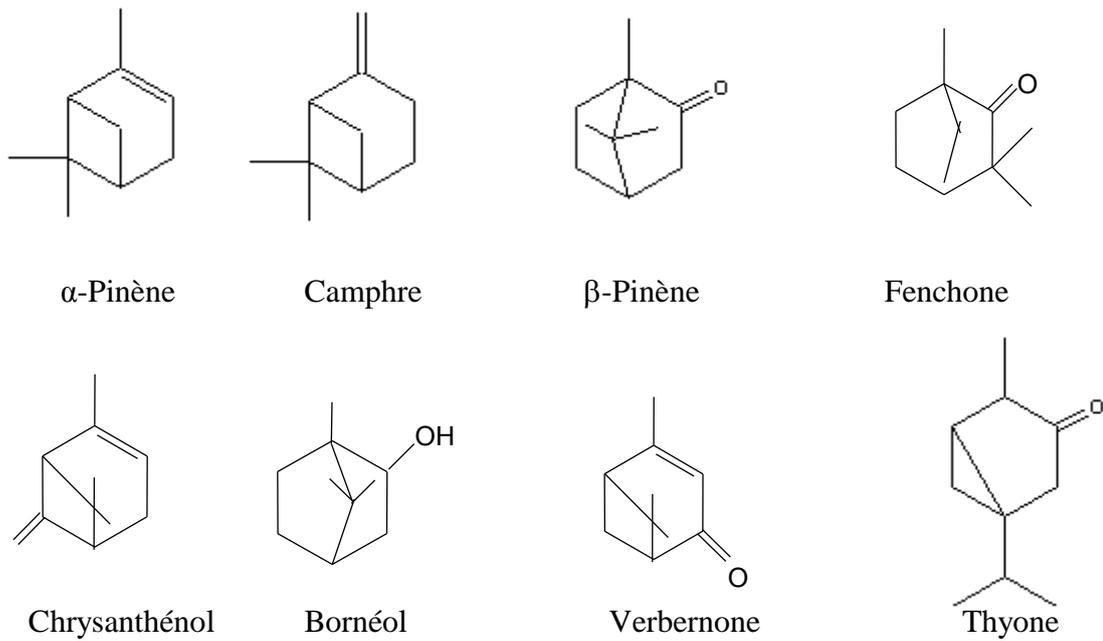
- Les hydrocarbures en  $C_{10}H_{20}$ : les menthanes (hydrocarbures saturés) n'existent pas à l'état naturel, mais on trouve leurs dérivés alcool et cétone correspondants: le menthol et la menthone.
- Les hydrocarbures en  $C_{10}H_{20}$  contenant un oxyde: dans cette famille, le cinéole ou l'eucalyptol sont très abondants.



**Figure 03 :** Structures de quelques Monoterpènes acycliques.



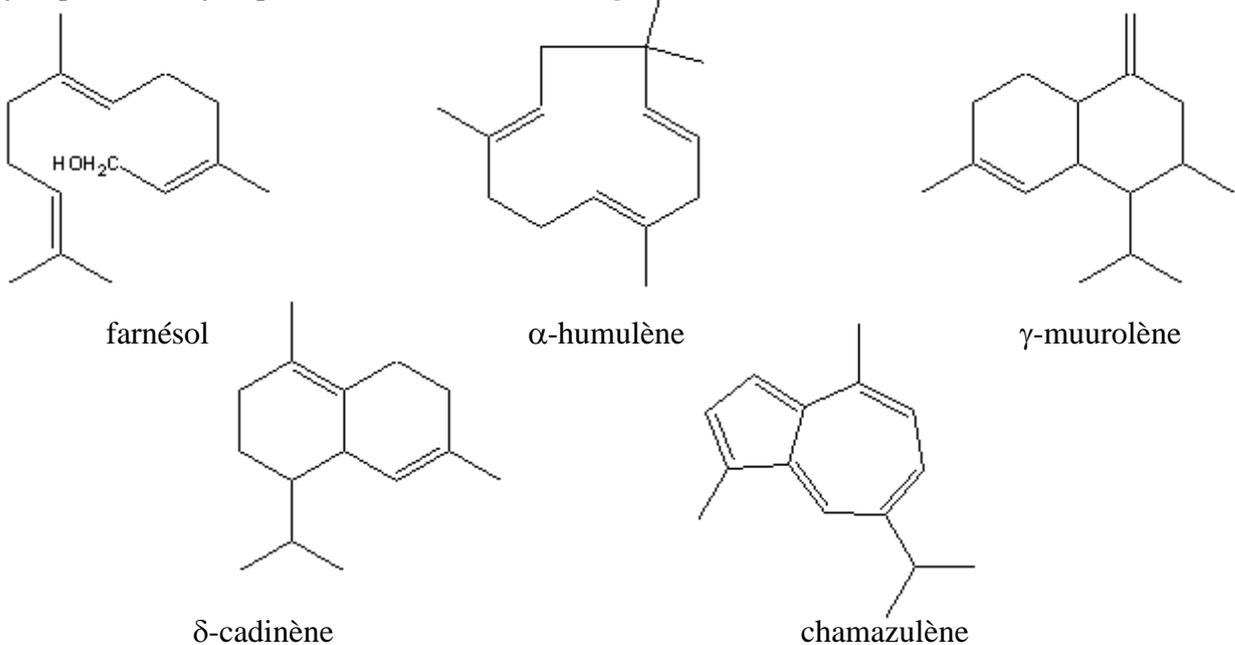
**Figure 04:** Structures de quelques Monoterpènes monocycliques.



**Figure 05:** Structure de quelques Monoterpènes bicycliques.

#### I.4.1.3. Sesquiterpènes (Composés à C<sub>15</sub>)

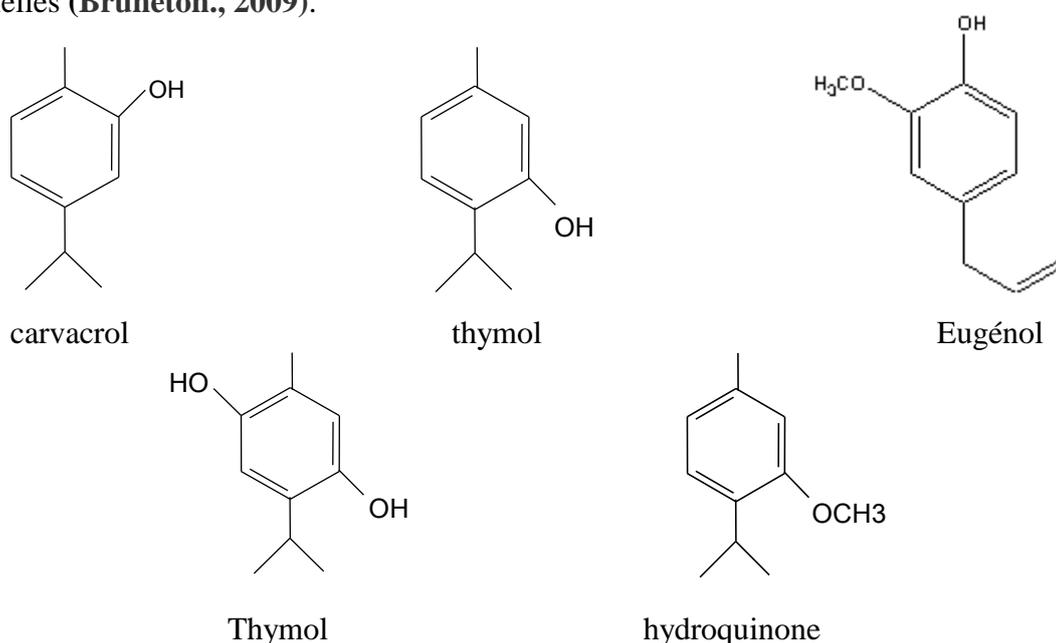
Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules (Malecky; 2008). Ce sont des hydrocarbures de formule C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> (n=3), soit une fois et demie (Sesqui) la molécule des terpènes vrais (en C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>), ils accompagnent le plus souvent et ressemblent dans leurs propriétés au monoterènes. Ils sont acycliques, monocycliques, bicycliques, et tricycliques comme le montre la Figure 06 (Messai., 2011).



**Figure 06 :** Structure de quelques sesquiterpènes.

### I.4.2. Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Il s'agit d'allyle et de propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles telle celle du girofle (eugénol) comme le montre la **Figure 07**. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en  $C_6-C_1$  comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilane de méthyle. Les lactones dérivées des acides cinnamiques (c'est-à-dire les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînables par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles (**Bruneton., 2009**).



**Figure 07:** Structure de quelques Exemple de composés aromatiques.

### I.4.3. Composés d'origines diverses

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers hydrocarbures aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation, carbures (linéaire ou ramifiée, saturés ou non et portant des fonctions acide ( $C_3$  à  $C_{10}$ ), alcools, aldéhydes (octanal, décanal ...etc.), esters, lactones, produits azotés ou soufrés (**Kambouche., 2000**).

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et absolues peuvent en renfermer. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'ils sont entraînés par la vapeur d'eau (**Bruneton ; 2009**).

## I.5. Caractéristiques physico-chimiques et contrôle de qualité des huiles essentielles

Eu égard à l'importance des huiles essentielles au point de vue industriel (cosmétiques, pharmaceutiques, et alimentaire), Une huile essentielle pure et naturelle est caractérisée par sa composition strictement végétale, contrairement aux essences synthétiques (Valnet., 1990). Selon la pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents indices physico-chimiques :

### I.5.1. Indices physiques et organoleptiques

L'aspect, la couleur et l'odeur d'une huile seront déterminés afin de pouvoir apprécier la qualité, et émettre un avis, tant sur le plan économique que scientifique.

Les huiles essentielles sont liquides à température ordinaire, d'odeur aromatique, rarement colorées quand elles sont fraîches. Leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau. Parmi les essences officinales, seules celles des cannelles, girofle et saffras sont plus denses que l'eau, elles ont un indice de réfraction élevé et, le plus souvent, sont douées de pouvoir rotatoire. Elles sont volatiles et entraînaibles par la vapeur d'eau, peu soluble dans l'eau mais elle lui communique leur odeur, elles sont très solubles dans la plus part des solvants organiques (alcool, éther...etc.) et les huiles fixes (Covarrubias., 2005).

### I.5.2. Indice chimiques

Les huiles essentielles se caractérisent par des indices chimiques qui permettent d'évaluer approximativement la quantité de fonctions chimiques (acides, ester, alcool...etc.) présente dans les composants d'une essence. De plus elles s'oxydent et se polymérisent facilement. C'est pourquoi il faut les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

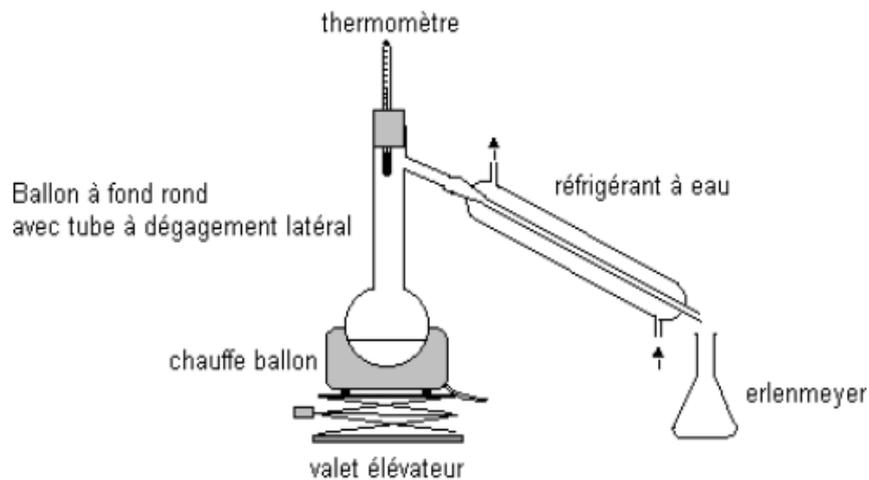
## I.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

### I.6.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

#### I.6.1.1. L'hydrodistillation

Consiste à porter un mélange (eau - produit naturel), à ébullition pour faire « éclater » les cellules végétales qui renferment les composés organiques odorants, puis à condenser les vapeurs qui se dégagent et entraînent avec eux ses composés (huiles essentielles) (Bruneton., 1999).

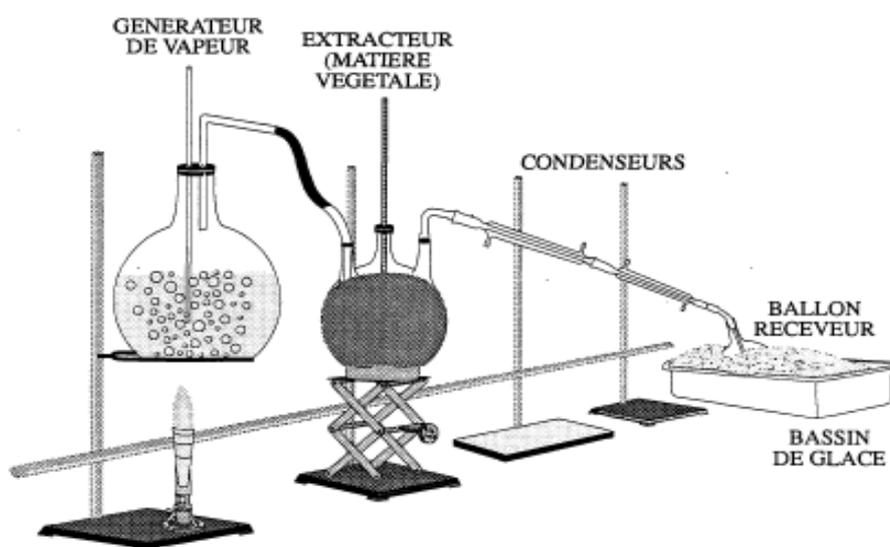
La condensation provoque la séparation du mélange gazeux en deux phases liquides, une supérieure, dite huile essentielles, contenant la majorité des composés odorants et l'autre inférieure, dite eau aromatique, qui n'en contient que très peu de composés odorants. Comme le montre la **Figure 08**.



**Figure 08:** Schéma d'un montage d'hydrodistillation.

### I.6.1.2. Distillation à la vapeur d'eau

Le matériel végétal comme le montre la **Figure 09**, est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable, les vapeurs saturées en composés volatils peu solubles dans l'eau (caractère hydrophobe, point d'ébullition relativement faible) sont condensées puis décantées, l'injection de vapeur se fait à la base de la cuve contenant la matière végétale, ce procédé est très recommandée pour l'extraction des huiles essentielles, car la matière végétale est séparée du chauffage ce qui diminue le contact direct et le risque d'endommager les huiles, en plus la matière végétale à distiller est en contact seulement avec la vapeur saturée qui ne risque jamais d'être surchauffée ce qui réduit l'hydrolyse.



**Figure 09:** Schéma de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Ces deux procédés sont les plus réputés car ils sont peu coûteux et facilement réalisables surtout au laboratoire.

### **I.6.2. Extraction par les solvants organiques**

Le principe de cette extraction consiste à faire macérer la plante dans le solvant à froid afin de faire passer les substances odorantes dans le solvant (**Djellouli., 2008**).

#### **I.6.2.1. Extraction par les solvants volatils**

La matière première est chargée dans l'extracteur puis elle est épuisée par des lavages successifs avec du solvant approprié. Après passage dans un décanteur ou on le laisse reposer cette phase de repos va permettre d'obtenir deux phases une aqueuse au fond et l'autre organique, puis dans un concentrateur, s'effectue la distillation partielle. On a d'un côté des molécules odorantes, des cires et des pigments et de l'autre, le solvant qui sera réutilisé.

#### **I.6.2.2. L'extraction par le Forane 113**

Cette technique récente permet d'extraire un mélange d'huile essentielle et d'huile lipidique en même temps, ce qui permet de valoriser doublement la plante. Cette technique nécessite un volume moindre de solvant, ce qui la rend plus avantageuse par rapport à l'hydrodistillation (**kambouche., 2000**).

#### **I.6.2.3. L'extraction au dioxyde de carbone supercritique**

L'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique est un exemple de technique simple, rapide, efficace et pratiquement sans solvant ni prétraitement (**Reverchon et De Marco., 2006 in Herzi ; 2013**). Ce nouveau procédé d'extraction utilise une propriété singulière du gaz carbonique lorsqu'il atteint un état supercritique (état intermédiaire entre le gaz et le liquide à une température supérieure à 31° et sous pression). Pour récupérer les composés organiques que l'on a cherché à extraire, il suffit de laisser le CO<sub>2</sub> s'échapper sous forme de gaz en le ramenant dans des conditions de pression et de température plus classiques.

Les objectifs de cette nouvelle technologie sont l'élimination de l'utilisation de solvant organique pour obtenir un produit pur et propre tout en diminuant la durée d'extraction et la consommation d'énergie. Ainsi, avec cette technologie il n'est plus nécessaire de purifier l'extrait en fin du traitement, contrairement aux solvants liquides (**Herzi., 2013**).

### **I.6.3. L'enfleurage**

Cette méthode se rapproche un peu de l'extraction par solvants volatils par son principe mais dans ce cas on utilise des graisses comme solvant, ces dernières ayant elles aussi une forte affinité avec les composés odorants (**Djellouli., 2008**). On distingue deux types d'enfleurage :

### I.6.3.1. L'enfleurage à froid

Cette technique permet de traiter les fleurs fragiles, après avoir été soigneusement triées, elles sont piquées délicatement dans la graisse. Qui absorbe l'odeur des fleurs pendant trois mois, jusqu'à saturation comme le montre la **Figure 10**. Cette graisse parfumée est introduite dans une batteuse avec de l'alcool. Le parfum ainsi agité quitte la graisse et se dissout dans l'alcool. On filtre le mélange pour obtenir ce que l'on appelle de l'absolue (**Sedik miloud., 2010**).



**Figure 10** : Schéma d'extraction par la graisse froide.

### I.6.3.2. L'enfleurage à chaud

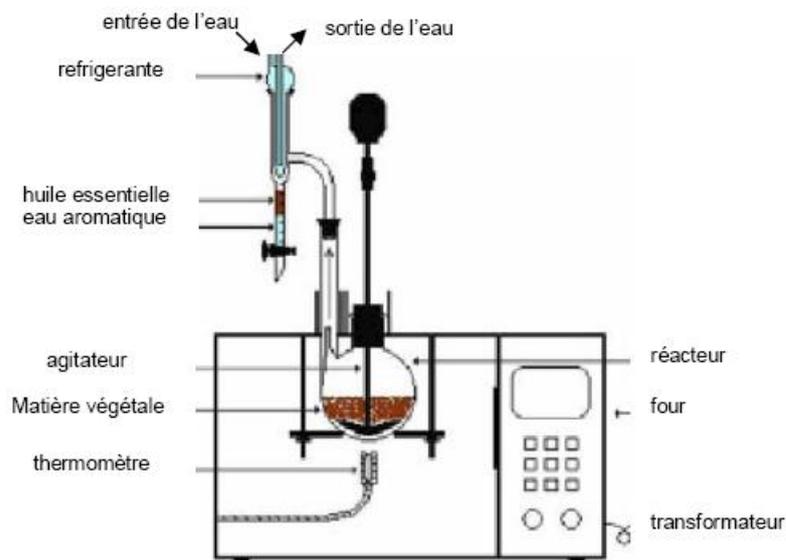
Ce procédé consiste à faire fondre de la graisse dans de grandes marmites chauffées au bain-marie et on y jetant les fleurs. On remuant le mélange pendant deux heures. Le lendemain, on enlève les fleurs de la veille avec une passoire plate et on les remplace par des fleurs fraîches. On répète au moins 10 fois l'opération. Lorsque la graisse ne peut plus absorber le parfum des fleurs, on filtre pour séparer la graisse des fleurs. On obtient une pâte parfumée appelée pommade que l'on traite par la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (**Bruneton., 1999**).

### I.6.4. L'expression à froid

Cette technique d'extraction est utilisée pour obtenir des essences d'agrumes contenues dans les zestes. Les fruits sont pressés à froid. Ensuite, par centrifugation, on sépare l'huile essentielle du jus de fruit. Cette technique permet d'extraire à faible coût des essences de bonne qualité. Les agrumes les plus utilisés sont la bergamote la mandarine, l'orange et le citron (**Lucchesi., 2005**).

### I.6.5. Distillation assistée par micro-ondes

Cette technique au même principe que la distillation simple sauf que le chauffage du ballon qui contient le matériel végétal et le solvant (eau ou solvant organique) se fait sous l'énergie micro-onde comme le montre la **Figure 11 (Fekih., 2015)**.



**Figure 11:** Montage d'hydro distillation assisté par micro-onde (**Elhaib., 2011**).

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et augmente le rendement d'extrait (**Rivera., 2006**).

### I.7. Conservation des huiles essentielles

Placés dans un réfrigérateur à la température entre 4 et 5°. La durée de conservation des huiles essentielles peut atteindre jusqu'à cinq années, si ces huiles sont mises dans des flacons bruns (évités la lumière) bien bouchés et entourés même avec du para film, en plaçant des billes de verres au fond des flacons afin de combler le vide pour éviter l'oxydation de ces huiles. La conservation des essences dans des congélateurs est contre indiquée (**Djellouli., 2008**).

### I.8. Rôles des huiles essentielles

Nul ne peut connaître ou définir le rôle exact des huiles essentielles chez les plantes, les nouvelles études ont montré qu'elles ont de très grands intérêts dans la vie de la plante. Parmi ses intérêts :

Elles favorisent la pollinisation par l'attraction de certains insectes, elles servent aussi à la protection de cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons et

inhibent la germination (**Stewart., 1978**). Elles participent à la défense des plantes contre les prédateurs (herbivores, insectes, micro-organismes...etc.) en paralysant les muscles masticateur des agresseurs par les propriétés toxiques et inappétantes des substances qu'elles contiennent, elles exaltent aussi une variété de goût et d'odeur dans l'atmosphère ce qui permet de les employées comme saveurs et condiments de choix (**Shakey., 2001 et Kambouche., 2000**).

On peut signaler que les huiles essentielles empêchent la perte d'eau par évaporation excessive et leurs composés réagissent comme donneurs d'hydrogène dans les réactions d'oxydoréduction (**Saad., 2006 et Shakey., 2001**).

Malgré tout ce qui est requis concernant la connaissance des rôles des huiles essentielles plusieurs phénomènes restent toujours inexplicables.

### **I.9. Utilisation industrielles des huiles essentielles**

Il existe une grande variété d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles, les différentes utilisations possibles et leur coût de production. On évalue qu'environ 300 produits naturels servent de matières premières pour l'industrie des parfums et des arômes (**Grysole., 2003**). Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre (4) grands secteurs industriels :

#### **I.9.1. Secteur parfumerie/ cosmétique**

L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. Toujours d'actualité, cet usage a cours particulièrement en Europe et aux États-Unis. Ces régions ont d'ailleurs développé des industries importantes qui se démarquent par leur haut niveau d'exportations dans ce domaine (**Grysole., 2003 in Saad., 2006**).

La consommation d'huiles dans ce secteur se caractérise par le besoin d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés (**Grysole., 2003**).

#### **I.9.2. Secteur parfumerie technique**

La parfumerie technique - qui comprend les produits d'entretien ménager domestiques ou industriels - a également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Par exemple, la citronnelle dégage un parfum qui indique au visiteur que l'endroit a été fraîchement lavé. Dans ce secteur, l'industrie consomme de grandes quantités d'huiles, au meilleur prix

possible, car l'industrie désire garder le prix de revient de son produit au minimum (**Grysole., 2003**).

### **I.9.3. Secteur alimentation :**

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût des aliments, pour parfumer et colorer. Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros consommateur d'huiles. Aussi, les fabricants d'aliments préparés en utilisent de plus en plus parce que le nombre de produits augmente et le consommateur recherche davantage les produits avec des ingrédients naturels. Dans ce secteur, les volumes d'huiles essentielles peuvent être très importants. L'huile la plus utilisée dans le monde est l'huile essentielle d'orange (**Grysole., 2003**).

### **I.9.4. Secteur médecine**

Dans le domaine de la santé, il faut distinguer le secteur pharmaceutique de celui des médecines douces. Dans ce deuxième secteur, les vertus thérapeutiques des huiles sont reconnues et utilisées depuis des siècles dans beaucoup de pays. En effet, ce marché a donné naissance à une industrie des produits naturels comme les produits homéopathiques. Cette industrie, très développée en Europe, bénéficie d'un attrait croissant de la part des consommateurs non seulement en Europe mais aussi en Amérique du Nord. De plus, les produits naturels avec effets thérapeutiques ont attiré l'attention des divers groupes pharmaceutiques (**Grysole., 2003**).

Les huiles à utilisation médicinale peuvent être vendues comme tel en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons... Ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalants pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge. Par conséquent, les huiles essentielles ont une variété d'applications et, dans bien des cas, la même huile peut être recherchée pour des propriétés différentes selon les secteurs industriels (**Grysole., 2003**).

### **I.10. Facteurs de variabilité des huiles essentielles**

Les huiles essentielles se retrouvent dans toutes les parties de la plante (écorces, racines, feuilles, fleurs et fruits) et dans toutes les régions climatiques du globe. Les facteurs environnementaux comme la température, l'irradiance et la photopériode peuvent jouer un rôle primordial sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle.

Les matières nutritives indispensables à la croissance de la plante, l'eau, les éléments minéraux et l'azote jouent également sur la composition chimique et la qualité de l'huile essentielle. En général, aussi longtemps que la chimiovariété [48] (La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce)

appropriée croît, le rendement maximal en huile peut être atteint en ajustant les éléments nutritifs pour optimiser la production de la biomasse, la récolte de la matière végétale pouvant coïncider avec la concentration maximale d'un composé recherché dans la plante.

### **I.11. Activités biologiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (**Elhaib., 2011**).

Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique (**Weera Chai et al., 2004 et Shigenhara., 2004**).

Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Pauli; 2003 et Holley et al., 2005**).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc. L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles les plus actives. Son composé majoritaire, le carvacrol, possède également une forte activité antimicrobienne. Les huiles de menthe et d'origan présentent des activités antibactériennes remarquables contre les souches à Gram positif et à Gram négatif (**Burt., 2004**). Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile (**Svoboda et Hampson., 1999**).

#### **I.11.1. Activité antibactérienne**

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une activité bactériostatique ou inhibition de la croissance. Le plus souvent, l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides.

Les huiles essentielles ont, longtemps, intéressé l'homme en raison des différentes propriétés qu'elles offrent (odeur agréable, arôme et propriétés préservatives) (**Wallace., 2004**). Elles sont, aussi, utilisées dans plusieurs domaines dont l'aromathérapie

(Buchbauer., 2000 in Lahlou., 2004).

Dans une étude, l'activité antibactérienne du Cinéole, du Citral, du Géraniol, du Linalool et du Menthol a été évaluée sur 18 espèces bactériennes Gram positif et Gram négatif. En termes d'activité antibactérienne, c'est le Linalool qui a montré une plus grande efficacité, en présentant une inhibition sur 17 des espèces étudiées, suivie par celle du Cinéole et du Géraniol (chacun d'eux inhibant 16 bactéries). L'activité, relativement, la plus faible, a été mise en évidence pour le Menthol et le Citral où seulement 15 et 14 espèces ont été, respectivement, inhibées (Rayour *et al.*, 2003 in Zhiri, 2006).

Une étude a examiné les activités antibactériennes d'huile essentielle, de poivre noir, de clou de girofle, de géranium, de noix de muscade, d'origan et de thym, contre 25 bactéries de genres différents. Les composants ayant des structures phénoliques tels que le Carvacrol, l'Eugénol et le Thymol étaient fortement actifs contre les microorganismes testés (Dorman *et al.*, 2000 in Zhiri., 2006).

### I.11.2. Activité antifongique

Les huiles essentielles agissent négativement contre le développement des champignons, en diminuant leur croissance. L'activité antifongique des HE a fait l'objet de plusieurs études scientifiques *in vitro*, depuis plusieurs années. Les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses. Elles donnent, parfois, des résultats différents, selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur. Certaines HE sont, également, actives sur des champignons responsables de mycoses.

L'activité antifongique du Cinéole, du Citral, du Géraniol, du Linalool et du Menthol a été, aussi, évaluée sur les champignons. L'efficacité la plus élevée a été révélée par le Citral et le Géraniol, en inhibant 12 espèces fongiques, suivie par celle du Linalool (10 espèces inhibées) puis celle des Cinéole et Menthol où 7 espèces de champignons ont été inhibées (Rayour *et al.*, 2003 in Zhiri., 2006, in Elhouiti., 2011).

En plus d'une activité antibactérienne, le Carvacrol et le Thymol présentent une activité antifongique contre les mycètes phytopathogène (Schwämmle *et al.*, 2001). Egalement, l'huile essentielle de la menthe pouliot, dont le composé majoritaire est la Pulégone (82%), est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre des espèces des genres *Penicillium* et *Mucor* (Belghazi *et al.*, 2002). Le Carvacrol et l'Eugénol pourraient être considérés comme de puissants agents antifongiques et pourraient être proposés comme agents thérapeutiques pour les candidoses buccales (Chami *et al.*, 2004 in Zhiri, 2006).

Une étude a évalué l'activité antimicrobienne de l'huile de clou de girofle sur toute une variété de champignons pathogènes, incluant ceux responsables d'infections

urogénitales. Par ailleurs, l'huile de clou de girofle a démontré une puissante activité antifongique contre des champignons pathogènes opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (Ahmad *et al.*, 2005).

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.

### I.11.3. Activité antiparasitaire

Les huiles essentielles détruisent les parasites. Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites ; celle des cétones et des lactones l'est moins.

Le Nérolidol, un sesquiterpène actif dans les feuilles de la plante de *Viola surinamensis* d'Amazonie, possède une activité antimalaria, prouvée par les études de (Lopes *et al.*, (1999) in Elhouiti., 2011). Son huile essentielle cause 100% d'inhibition du développement de l'agent infectieux. Cette activité serait liée à l'inhibition de la biosynthèse des glycoprotéines.

### I.11.4. Activité antivirale

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques contenues dans les huiles essentielles. Ce qui leur confère la capacité de combattre certaines pathologies virales. Les huiles essentielles arrêtent le développement des virus et facilitent l'élimination du mucus, tout en stimulant le système immunitaire (Buronzo., 2008).

Les virus responsables de certaines pathologies comme le zona, l'herpès, la grippe, le sida sont traités avec succès par certaines huiles essentielles. Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques et certaines pathologies virales graves se trouvent très nettement améliorées grâce à elles.

Récemment, une étude *in vitro* a montré l'effet antiviral de l'huile essentielle d'origan et du girofle sur le virus Type 1 de l'herpès simplex ainsi que sur le virus de la maladie de Newcastle (Siddiqui *et al.*, 1998). Le triterpénoïde, l'acide betulinique est un de plusieurs terpénoïdes qui ont montré une action inhibitrice envers le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

L'efficacité de l'huile de *Melaleuca alternifolia* (Le théier) et celle d'eucalyptus collectés en Australie a été mise en évidence sur le virus de l'herpès simplex dans des cultures cellulaires (Schnitzler *et al.*, (2001) in Elhouiti., 2011).

### I.11.5. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard., 1992**).

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (**Multon., 2002**). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc. (**Madhavi et al., 1996**).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (**Caillet et Lacroix, 2007 in Elhouiti., 2011**).

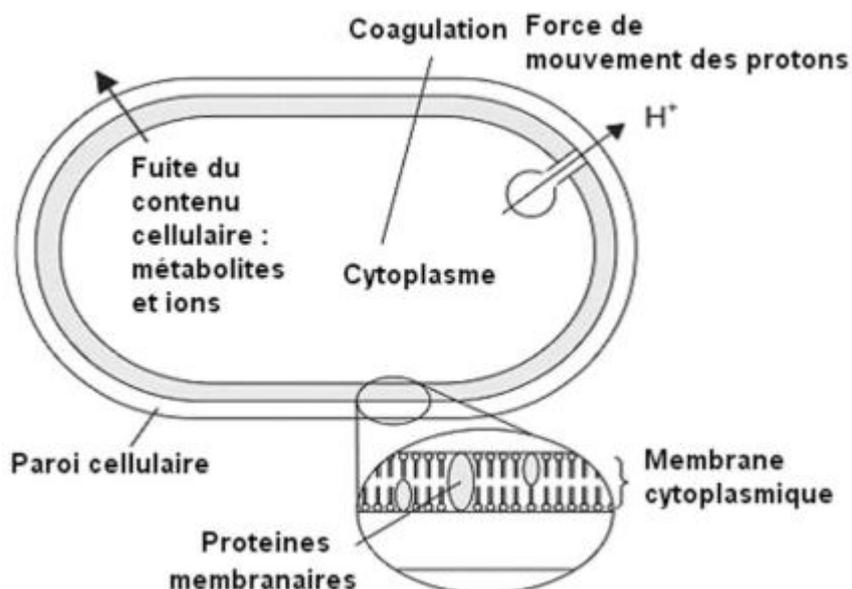
### I.12. Mode d'action des huiles essentielles contre les bactéries

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire (**El Kalamouni, 2010**). Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action d'une manière générale, leur action se déroule en cinq phases comme le montre la **Figure 12** :

- l'altération de la paroi cellulaire, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la fuite du contenu cellulaire.
- la dégradation de la membrane cytoplasmique.
- l'altération des protéines membranaires.
- la coagulation du cytoplasme.

- l'épuisement de la force de mouvement des protons.

Une caractéristique importante des huiles essentielles et de leurs constituants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire (Paul Goetz et al., 2012)



**Figure 12 :** Principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles (Paul Goetz et al., 2012).

### II.13. Toxicité des huiles essentielles :

La toxicité de nombreux produits commerciaux a fait l'objet de plusieurs études ou recherches sauf que la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée et de même les interactions de ces huiles essentielles avec les médicaments sont aussi peu mentionnées. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi (Pipiri., 2006).

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement thérapeutique telles que l'aromathérapie (définie comme le traitement des maladies par les essences de plantes ainsi que la connotation " produit naturel" attaché à ces produits conduit à une utilisation souvent abusive.

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue; on manque aussi des données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes, tératogènes ou cancérigènes. On

connaît par contre beaucoup mieux le risque de toxicité aigüe lie à une ingestion massive, en particulier la neurotoxicité des huiles essentielles à thuyone (thuya, absinthe, sauge officinale) ou à pinocamphone (hysope). Ces cétones induisent des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation.

De telles intoxications ne sont pas exceptionnelles. D'autres monoterpènes sont également toxiques à doses fortes, exemples: camphre, menthol (qui entraînent un risque de spasme de glotte chez le jeune enfant), cinéole, E-anéthol. Cette toxicité non négligeable conduit à adopter une attitude prudente face aux pratiques telles que l'aromathérapie lorsqu'elles utilisent des huiles essentielles -pures et à fortes doses - par voie orale et, à fortiori, en mélange (**Bruneton., 1993**).

***Chapitre II***  
***Généralités sur la famille***  
***des Asteraceae***

## II.1. La famille des Asteraceae

La famille des Astéracées (Compositae) est la famille des phanérogames qui regroupe le plus grand nombre d'espèces décrites et acceptées. A supposer qu'il existe 250000 à 350000 espèces de plantes à fleurs, 1/8 à 1/12 des espèces sont des *Asteraceae* (près de 10%).

Le nombre de genres et espèces que contient cette famille a été fortement discutée. Selon la classification de **Bremer (1994)**, la famille des Asteraceae comprend 1535 genres et environ 23000 espèces. Selon le *royal botanical garden of Kew*, elle comprend entre 24000 et 30000 espèces groupées en 1600 à 2000 genres. Pour **Khatun (2002)**, la famille des Asteraceae comprend 1100 genres et 25000 espèces. **Naik (2003)** a estimé le nombre d'espèces à 20000 espèces groupées en 1000 genres. **Sharma et al. (2004)** ont trouvé 20000 espèces réparties en 950 genres. **Sambamurty (2005)** parle de 900 genres comprenant 13000 espèces (**Benamara-Bellagha., 2015**).

Les espèces d'*Asteraceae* font l'objet de beaucoup d'études traitants l'évolution et récemment, elles sont devenues l'objet de nouveaux programmes de séquençage de génomes (**Mahbubur Rahman., 2013**).

### II.2.1. Caractéristiques générales des Asteraceae

Les Astéracées ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelé un involucre. Ainsi, contrairement à l'opinion populaire, ce qu'on appelle une « fleur » de tournesol, de chardon, ou de pissenlit, n'est en réalité pas « une » fleur mais un capitule de fleurs.

Bien que la famille soit bien définie, beaucoup de variations entre les membres ont été constatées : ils peuvent varier d'herbes annuelles et vivaces à arbustes ou même arbres. Peu sont de véritables épiphytes. Ils poussent dans presque tous les types d'habitats : dans les forêts et les prairies de hautes altitudes. Ils sont moins fréquents dans les forêts tropicales (**Funk et al., 2009**).

### II.2.2. Types de fleurs des Asteraceae :

Selon **Chibani (2013)** On peut diviser les fleurs des Asteraceae, appelées aussi fleurons, en trois groupes suivant l'aspect des capitules :

**a) Les liguliflores**

Les fleurs sont composées uniquement de fleurons ligulés. Elles présentent des languettes, ou ligules, dans lesquelles les équivalents des pétales sont soudés, généralement par cinq, parfois par trois, reconnaissables seulement aux dents de la languette, et où un pétale prédomine comme le montre la **Figure 13**.



**Figure 13** : Fleurons ligulés (fleur de pissenlit).

**b) Les tubuliflores**

Ce sont des fleurs dont le capitule n'est composé que de fleuron tubulés (ou fleurs tubulaires). Elles présentent des tubes terminés par des lèvres imperceptibles ou s'ouvrant plus ou moins largement en cinq lobes comme le montre la **Figure 14**.



**Figure 14** : Fleurons tubulés (fleur de *Cotula cinerea*).

**c) Les radiées**

Aux fleurons périphériques ligulés entourant un disque de fleurons tubulés (marguerite, aster, séneçon ...etc.) (**Barreda et al., 2010**). En faisant la synthèse des deux types de fleurons on obtient les radiées dont le capitule est composé de ligules imitant les pétales à la périphérie et de tubules imitant les étamines et le pistil au centre (**Florin., 2008 et**

**Spichiger., 2004**). Cinq étamines soudées en tube par les anthères, autour du style comme le montre la **Figure 15**.



**Figure 15** : Fleurons ligulés et tubulés (marguerite).

### **II.2.3. Utilisations et intérêts économiques des Asteraceae**

Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster.

Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie: l'Arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antennaria* *Djioa* Gartn), le tussilage (*Tussilago farfara* L.). Certains comme le genre *Pyrethrum* fournissent un insecticide, d'autres (genre *Artemisia*) sont utilisés comme plantes médicinales et dans la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi (**Boutachane., 2013**).

*Partie II*  
*Matériels et Méthodes*

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans les zones semi-arides, au Sud-ouest de l'Algérie, Université Tahri Mohamed Béchar.

### II.1. Enquête ethnobotanique

La flore saharienne offre une richesse floristique importante réputée pour son usage thérapeutique traditionnel. Ce dernier est fréquent surtout dans les zones rurales où le recours à la plante médicinale atteint la plus part de la population locale. Dans cet objectif, nous avons mené une étude ethnobotanique, dans la wilaya de Béchar et ces communes (Lahmer, Boukais, Abadla, Kenadsa, Beni Ounif et Taghit), durant trois mois, en utilisant une fiche d'enquête comme le montre la **Figure 16**.

Laboratoire de valorisation des ressources végétale et sécurité des aliments dans les zones semi-arides sud-ouest de l'Algérie, université Tahri Mohamed de Béchar, Algérie.

**Etude ethnobotanique**

Nom : .....

Prénom : .....

Sexe : ..... Age : ..... Ville : .....

Nom de la plante : .....

Maladies traitées : .....

.....

.....

Partie de la plante utilisée : ..... Feuille ..... Tige ..... Fleur ..... Fruit  
..... Graine ..... Racine ..... Partie aérienne

Mode d'utilisation : .....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

**Figure 16** : Fiche d'enquête ethnobotanique.

L'enquête a été réalisée sur un échantillon de 180 individus composé d'hommes et de femmes choisis selon un âge compris entre 20 et 70 ans. Le questionnaire a été conçu pour obtenir des données relatives à l'âge et au sexe de l'utilisateur d'une part et, d'autre part, des informations sur la maladie traitée, la plante utilisée, la partie de la plante et le mode de préparation des deux plantes. L'objet de cette étude consiste à collecter le maximum

d'informations sur les deux plantes médicinales *Cotula cinerea* et *Warionia saharae* fréquemment utilisé en médecine traditionnelle par la population locale et leurs usages thérapeutiques qui y sont pratiqués.

### II.1.1. Description de la région d'étude

La willaya de Béchar comme le montre la carte sur la **Figure 17**, s'étend sur une superficie de 5050 km<sup>2</sup> (Saad ; 2006), elle est située à une distance de 950km au sud-ouest de la capitale Alger, sa position géographique sur la porte de l'ancienne piste du commerce caravanier appelé la vallée de la Saoura. Béchar constitue un relais important entre l'Algérie et l'Afrique sub-saharienne (**Djellouli ; 2013**).



**Figure 17:** Situation géographique de la région de Bechar et la ville de Bechar en rouge sur la carte Algérienne.

Tout le système de circulation dans l'ensemble de la région sud-ouest Algérien s'ordonne autour de la ville de Béchar qui s'affirme comme un relais très important dans l'armature urbaine algérienne autant que rôle administratif.

Oued Béchar, est un des éléments naturels qui forment le cadre géographique de la ville de Béchar. Il draine avec de nombreux affluent un bassin de 1500km alimenté par les eaux d'écoulements du djebel Grouz, soit un parcours du nord-est au sud-ouest après la ville de Béchar, l'oued prend nom de Bou-Dnib se dirige vers le sud ou ses crues se perdent dans la dépression de Daiet-Tiour sans atteindre à la plaine de Abadla (**Lefkir ; 2005**).

### II.1.2. Le climat de la région d'étude

- **La pluviosité**

La faiblesse de la pluviosité est le caractère fondamental du climat saharien. La région de Béchar est arrosée de façon très irrégulière Cependant, des pluies diluviennes peuvent

aussi se produire au Sahara. Des fois la région de Béchar reçoit plus que 74mm en deux ou trois heures alors que sa moyenne annuelle se situe entre 50 et 150 mm (Djellouli ; 2008).

- **Les températures**

Le climat thermique est le même que le climat thermique du Sahara septentrional. Il est assez uniforme; les étés ne sont guère moins torrides que ceux de la zone centrale. Juin, juillet et août sont les mois les plus chauds des zones septentrionale et centrale. Juillet est le mois le plus chaud avec, en année normale, une moyenne des maxima quotidiens comprise entre 40° C et 45° C, selon les localités. Les plus hautes températures ont été observées à Bénis Abbes avec 46° C et à Taghit avec 48° C. En hiver, il gèle presque partout. Les températures les plus basses enregistrées atteignent - 6°C à Béchar et à Béni Abbes (Lefkir., 2005).

- **Le vent**

Le vent est l'autre caractéristique permanente du Sahara. Les vents dominants sont du nord et du sud-ouest annuellement et le changement de direction est en fonction des saisons. En été et en automne, ils soufflent du nord au nord-ouest, au printemps les vents soufflent de l'est puis continent, leur évolution pour devenir des vents de sud à sud-ouest. Les vents de sable se manifestent généralement du mois de mars au mois d'août pour atteindre un minimum au mois de décembre. Ces vents de sable ont tendance à souffler entre le sud-ouest et le nord, ils sont plus chauds et sec ils soufflent violemment par rafales et forme des tourbillons (Lefkir ; 2005).

## II.2. Matériels biologiques

### II.2.1. présentation des plantes étudiées

#### II.2.1.1. La plantes *Cotula cinerea* (Del)

- ❖ **Classification botanique**

**Règne:** Plantes (Végétal)

**Embranchement:** Spermatophytes

**Sous Embranchement:** Angiospermes

**Classe:** Dicotylédones

**Ordre:** Asterales

**Famille:** Asteraceae

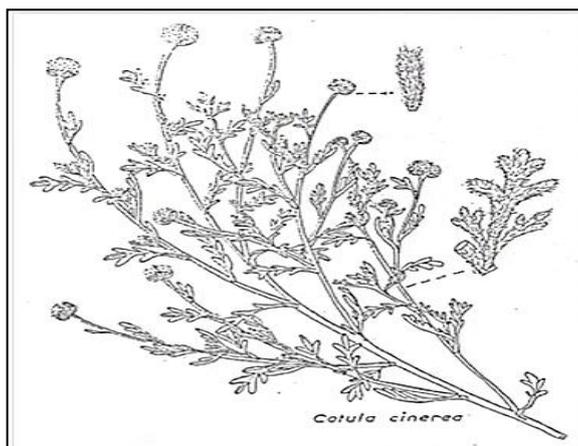
**Genre:** *Cotula*

**Nom Latin:** *Cotula cinerea*

**Nom vernaculaire:** El Guertoufa



**Figure 18:** La plantes *Cotula cinerea*. (Del).



**Figure 19:** Morphologie générale de la plante *Cotula cinerea* (Del) (Ozenda., 2003).

#### ❖ Description botanique

L'espèce *Cotula Cinerea* (Del) (syn : *Brocchia cinerea*): nom vernaculaire (Guertoufa) (Markouk et al., 1999). C'est une petite plante à feuilles laineuses blanchâtres, épaisses, divisées dans leur partie supérieure en 3 à 5 dents obtuses ; tiges de 10-40 cm, couchées puis redressées ; capitules de 6 à 10 mm de diamètre, à involucre laineux à fleurs toutes tubuleuses, brunes en boutons puis jaune d'or lorsqu'elles s'ouvrent comme le montre les Figures 18 et 19 (Ozenda., 2003 et Djellouli et al., 2013).

#### ❖ Répartition géographique

Cette plante est endémique du Sahara, elle habite généralement les petites dépressions un peu sablonneux et se rencontre dans tout le Sahara septentrional et Sahara centrale.

#### ❖ Usage populaire

*Cotula cinerea* est citée comme plante médicinale spontanée (Maiza K et al., 1993). Très connue par les populations des régions sahariennes, pour ses applications thérapeutiques. Cette plante est très utilisée en médecine traditionnelles de la région de sud-ouest algérien et même au sud est marocain, pour le traitement de plusieurs maladies, parmi ces maladies il y'a : Coliques, Toux, Diarrhée, Migraine, Maux de tête et le Désordres digestifs (Djellouli et al., 2013). Toutes les parties de la plante sont utilisées, Suite à la maladie traitée, cette plante est utilisées sous différentes formes : Macération, Décoction, Infusion ou Inhalation (Djellouli et al., 2013). Dans le Sahara, cette plante est très appréciée si elle est ajoutée dans le thé vert, on la trouve aussi utilisé comme condiment pour améliorer la saveur des soupes.

### II.2.1.2. La plante *Warionia saharae* (Ben & Coss)

#### ❖ Classification botanique

**Règne:** Plantes (Végétal)

**Embranchement:** Spermatophytes

**Sous Embranchement:** Angiospermes

**Classe:** Dicotylédones

**Ordre:** Asterales

**Famille:** Asteraceae

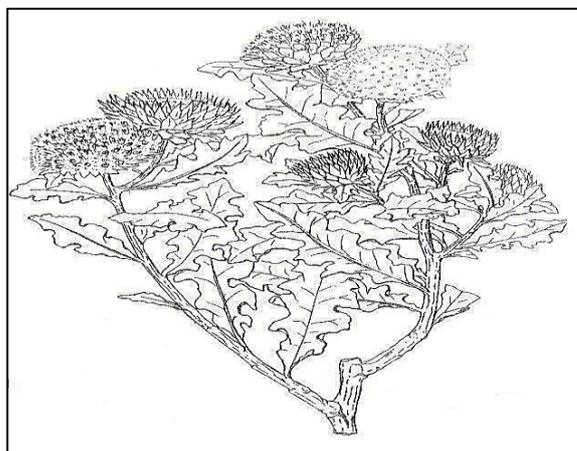
**Genre:** *Warionia*

**Nom Latin:** *Warionia saharae*



**Nom vernaculaire:** Kebar lamaiz

**Figure 20:** La plantes *Warionia saharae* (Bent & coss).



**Figure 21:** Morphologie générale de la plante *Warionia saharae* (Ben & Coss) (Ozenda., 2003).

#### ❖ Description botanique

*Warionia saharae* est un Arbuste de 5-10dm à tronc épais, à rameaux courts portant des feuilles vert sombre et glabres, simiées, ondulées sur les bords, contenant un latex blanc et ouvertes de petites glandes qui donnent à la plantes une odeur extrêmement félie et tenace ; grandes capitules (3-4cm) à bractées très nombreuses, larges et coriaces, fleurs jaunes, toutes tubuleuses, à corolle régulière ou terminée par deux lèvres, à chaînes velues sarmentés d'une longue aigrette de poils rudes comme le montre les **Figures 20 et 21** (Ozenda., 2003).

#### ❖ Répartition géographique

Cette plante est endémique du Sahara, on la trouve au sud-est marocain et au sud oranais, surtout dans la région de beni ounif, Zouzfana, Béchar et Boukais (Ozenda., 2003).

#### ❖ Usage populaire

Comme la plante *Cotula cinerea*, la plante *Warionia saharae* est citée comme plante médicinale spontanée (Maiza K et al., 1993). Très connue par les populations des régions sahariennes, pour ses applications thérapeutiques. Cette plante est très utilisée en médecine traditionnelles de la région de sud-ouest algérien et même au sud est marocain, pour le traitement de plusieurs maladies, parmi ces maladies il y'a : les maladies gastro-intestinales (Mezhoud et al., 2012) rhumatismes comme anti-inflammatoire et l'ictère, comme on peut l'utilisé comme calmant ou drogue Suite à la maladie traitée, cette plante est utilisée sous différentes formes : Macération, Décoction ou Infusion. Au Maroc La décoction de feuilles séchées est utilisée comme antirhumatismal, pour des troubles gastro-intestinaux et contre la crise épileptique (Bellakhdar et al., 1986).

#### II.2.1.3. La récolte des plantes étudiées

La récolte des espèces *Cotula cinerea* et *Warionia saharae* de la famille des *Asteracées*, a été réalisé dans la région nord de la ville de Béchar, entre le mois de février et le mois d'avril 2013. L'identification des espèces végétales a été réalisée au niveau de l'Agence Nationale pour la Protection de la Nature (ANN) de la ville de Béchar, et un spécimen de chaque plante a été déposé au niveau du laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité alimentaire dans les zones semi-arides, au Sud-ouest de l'Algérie, Université Tahri Mohamed Béchar.

#### II.2.1.4. La conservation des échantillons

Les échantillons fraîchement collectés, après séparation des fleurs et des racines, les parties aériennes ont étaient découpés en petits morceaux puis séchée pendant deux à trois semaines dans un endroit sec et aéré au laboratoire à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité.

#### II.2.2. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes ayant fait l'objet de cette étude ont été fournies par le Laboratoire de valorisation des ressources végétale et sécurité des aliments dans les zones semi-arides sud-ouest de l'Algérie, Université Tahri Mohamed de Béchar, Algérie. Le choix des microorganismes a été porté sur dix souches microbiennes fréquentes en pathologie humaine et animale, appartenant à des familles différentes et à des catégories différentes trois bactéries à Gram positif (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)), trois bactéries à Gram négatif (*Salmonella typhi* (ATCC 25922), *Escherichia Coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aëruginea* (ATCC 27853)) et quatre souches fongiques (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochratus*, *Aspergillus niger* et *Penicillium expansum*) présentées dans le Tableau 02.

Tableau 02: Pouvoir pathogène des souches microbiennes testées

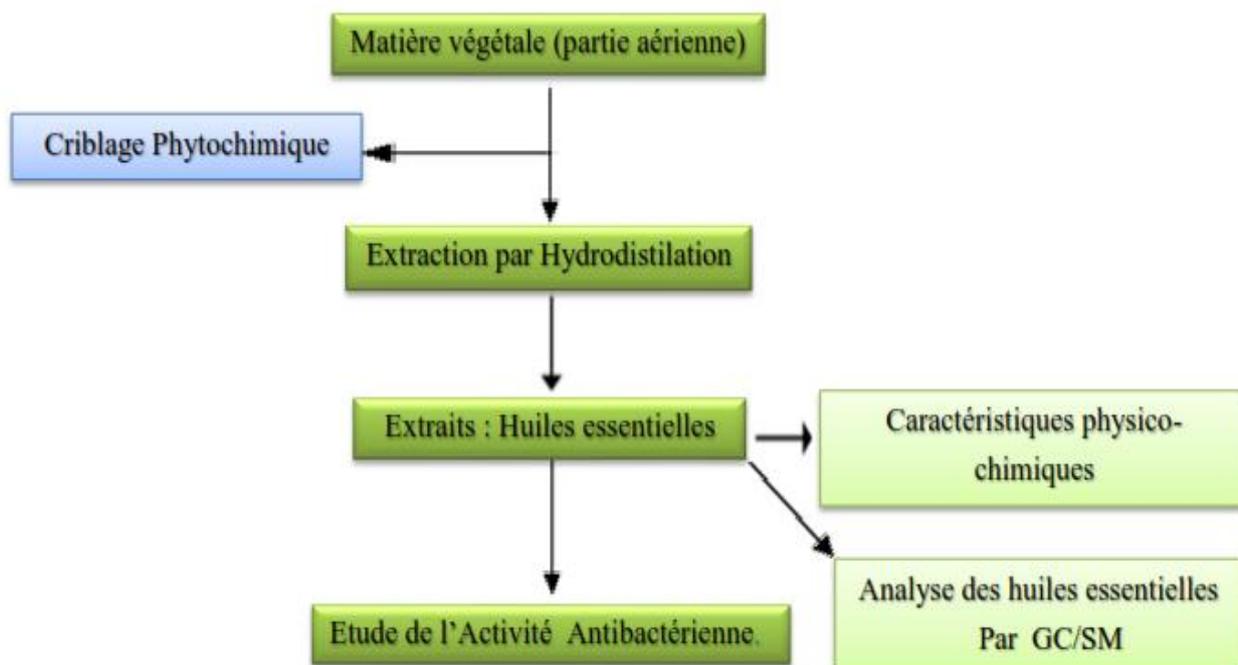
	Souches microbiennes	Références	Pouvoir pathogène
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-Méningites, méningo-encéphalites, encéphalites, septicémie. Infection bénigne pour la femme
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-Infections cutanées, Plaies, Brulures, abcès, Ostéites, Ostéomyélites, Endocardites, Septicémies, Infections pulmonaires, Intoxication alimentaires
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-Infections urinaires. Infections intra-abdominales (biliaires, péritonites ...). Infections nosocomiales (sepsis, pneumonies, endocardite)
	<i>Salmonella Typhi</i>	ATCC 25922	-Toxi-infections alimentaires, Infections pleuro-pulmonaire Septicémies,
Gram (+)	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-Infections urinaires, Plaies, Septicémies, Infections respiratoires
	<i>Pseudomonas aeroginisa</i>	ATCC 27853	-Infections pulmonaires et urinaires, Brulures, Plaies, Septicémies
	<i>Aspergillus flavus</i>	MNHN 994294	-Aspergilloses pulmonaires ou généralisées
Moissures	<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	- Cancérogène, tératogène, néfrotoxigène Causé par la production d'ochratoxines
	<i>Aspergillus niger</i>		-Aspergilloses, des otites et des sinusites, infections cutanées, pulmonaires et généralisées
	<i>Penicillium expansum</i>	-	Neuro et Cytotoxicité causé par la patuline, Cancer.

### II.3. Méthodes

Après la collecte des deux plantes, nous avons procédé à :

1. Un criblage phytochimique pour déterminer les différentes classes de substances naturelles présentes dans les deux plantes.
2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation et calcul des rendements.
3. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles.
4. Analyse chromatographique et identification des constituants des huiles essentielles par GC/MS.
5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles.

L'ensemble du travail que nous avons mené dans cette étude se structure comme illustré dans le schéma ci-après dans la **Figure 22**:



**Figure 22** : Les différentes étapes de notre travail.

### II.3.1. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est un ensemble de méthodes et de techniques expérimentales usuelles de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles issues de métabolismes secondaires. Ces techniques et méthodes permettent de détecter, dans la plante, la présence des produits appartenant à des classes de composés physiologiquement actifs.

#### ❖ Les stérols insaturés et terpènes

Les terpènes sont des constituants habituels des cellules végétales, Ils peuvent s'impliquer dans les fonctions métaboliques essentielles. Ils constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux, cette odeur est due à la libération de molécules très volatiles (Malecky., 2008). La présence des stérols insaturés et terpènes est mis en évidence par le protocole expérimentale suivant :

Dans un bécher on met 3g de matière végétale en présence de 20ml de chloroforme, porter l'ensemble sur plaque chauffante pendant 15 min, filtrer le mélange en suite mètre le filtrat dans un tube à essai, ajouter 1ml de  $H_2SO_4$  avec précaution sur les parois du tube l'apparition à l'intersection entre les deux phases d'une couleur verte qui se transforme en rouge signale l'existence des stérols insaturés et terpènes.

#### ❖ Les Stéroïdes

Dans un flacon, mettre 3g de matière végétale en poudre en présence de 20ml d'éthanol 70% pendant 48 heures, filtrer le mélange en suite soumettre le macéra aux tests suivants :

Evaporer la solution, dissoudre le résidu avec 15 ml de chloroforme  $CHCl_3$  et on filtre plusieurs fois (3 fois) on divise le filtrat en deux parties dans deux tubes à essai :

- **Essai 1** : Ajouter 1ml de  $CH_3CO_2H$  puis 1ml de  $H_2SO_4$  concentré sur les parois du tube avec précaution. L'absence de la couleur verte indique la présence des stérols insaturés
- **Essai 2** : Ajouter à volume égal du  $H_2SO_4$  concentré sur les parois du tube avec précaution l'apparition du couleur jaune qui se transforme en rouge indique l'existence du stéroïde.

#### ❖ Les alcaloïdes

On met 5g de matière végétale dans un bêcher, avec 50ml de HCl dilué et on porte l'ensemble sur une plaque chauffante pendant 15 min, puis on filtre le mélange, pour le test suivant :

Alcalise l'extrait acide avec l'ammoniac ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) jusqu'à l'obtention de  $\text{PH}=9-10$ , extraire la solution trois fois avec 30ml de chloroforme à l'aide d'une ampoule à décanter, évaporer la phase organique puis ajouter 5ml d'HCl dilué, traiter la solution avec 2 ou 3 gouttes du réactif de Mayer. L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes

#### ❖ Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à mettre 5g de matière végétale dans un flacon en présence de 75ml d'acide chlorhydrique HCl dilué pendant 48 heures, filtrer le mélange en suite soumettre le macéra aux tests suivants:

- 10 ml de filtrant alcaliser par  $\text{NH}_4\text{OH}$  l'apparition de la couleur jaune claire indique la présence des flavonoïdes.
- A 10ml du filtrant ajouter 5ml de l'alcool amylique, la phase alcoolique se colore en jaune indique la présence des flavonoïdes libres.
- Evaporer sous vide la phase aqueuse du 1<sup>er</sup> test dissoudre le résidu avec 3ml d'acide chlorhydrique (HCl) dilué et on chauffe légèrement puis on refroidit pour réaliser les tests :
  - a) Ajouter 2,5ml d'alcool amylique, l'apparition de la couleur jaune indique la présence des hétérosides flavoniques.
  - b) Ajouter une petite quantité de magnésium (Mg) à l'extrait acide l'absence de la couleur rouge indique l'absence des glucosides flavoniques.

#### ❖ Les Tanins

La présence des tanins est mise en évidence par le dépôt de 3g de la matière végétale en présence de 20 ml d'éthanol dans un bécher puis l'ensemble est chauffé pendant 15 min, le mélange est filtré puis l'extrait éthanolique est soumis au test suivant:

Traiter 5ml de la solution avec quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$ . L'apparition d'une coloration verte indique l'existence des tanins

#### ❖ Les Saponosides

Pour les saponosides, on met dans un bécher 3g de la matière végétale en présence de 20 ml d'eau distillé porter l'ensemble dans plaque chauffante pendant 10min à une température inférieure à la température d'ébullition, filtrer le mélange, puis soumettre l'extrait au test suivant:

Faire refroidir la solution et ajouter 8 ml de la solution dans un tube à essai, puis on agite fortement pendant 60 secondes et on laisse reposer 30 secondes et on mesure la hauteur de la mousse.

### ❖ Les Cardinolides

3 g de l'extrait de matière végétale macérée dans 20 ml d'eau distillée pendant 24 heures. La filtration de la solution et de l'extraction 10 ml du filtrat avec 10 ml chloroforme/méthanol évaporer la phase organique et dissoudre le résidu dans 3 ml d'acide acétique glacière, l'addition de quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  et 1 ml d'acide sulfurique concentré l'apparition de la couleur bleu verte dans la phase acétique indique l'existence des Cardinolides.

### II.3.2. Extraction des huiles essentielles

Comme nous l'avons déjà cité dans la première partie, l'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal ou végétal) selon diverses techniques. L'extraction de molécules organiques occupe une phase primordiale dans les domaines de la chimie des substances naturelles et de la chimie thérapeutique (**Djellouli., 2008**).

### ❖ Appareillage

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée par hydrodistillation en utilisant l'appareillage représenté dans la **Figure 23** ci-dessous.



**Figure 23** : Montage hydrodistillation.

- **Mode opératoire**

On fait chauffer pendant dans un ballon de 2 litres qui contient 200 g de matière végétale (sèche ou fraîche) avec 1 litre d'eau distillée et quelques morceaux de pierre ponce qui assure le brassage de la solution, jusqu'à ébullition, le ballon est relié à l'aide d'un raccord à un réfrigérant. Ce dernier permet de condenser les vapeurs provenant du mélange.

Le distillat recueilli est placé dans un flacon. L'huile essentielle est séparée du distillat suite à une extraction liquide-liquide par le dichlorométhane, après décantation, le solvant est évaporé séché à l'aide de sulfate de magnésium anhydre puis évaporé au bain marie sous la hotte ainsi cette huile récupérée est conservée à l'obscurité et à basse température (4-5°C) dans des flacons hermétiquement fermés pour éviter toute dégradation ou évaporation.

- ❖ **Calcul des rendements :**

Le rendement ou la teneur en huiles essentielles calculé par la formule ci-dessous, est définie comme étant le rapport de la quantité d'huile recueillie après distillation sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage (**Djellouli ; 2008**). Les quantités d'huile essentielle proviennent du cumul d'au moins cinq distillations.

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

Ou :

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

$m_2$  : Masse de la matière végétale traitée, en gramme.

R : Rendement en huile essentielle.

### **II.3.3. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles**

Ces analyses sont faites en conformité aux normes A.F.N.O.R (1994). Nous avons déterminé quelques caractères physiques à savoir la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, la solubilité dans l'alcool et le point de congélation et deux indices chimiques en l'occurrence l'indice d'acide et l'indice d'ester.

#### **2) Caractères physiques**

##### **a) Densité relative (AFNOR, 1994)**

- **Définition**

La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à la masse d'un égal volume d'eau distillée.

- **Principe**

A l'aide d'un pycnomètre, peser successivement des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température de 20 °C. La densité est donnée par la formule :

$$d_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1}$$

Où

- $m_0$  : Masse en grammes du pycnomètre vide
- $m_1$  : Masse en grammes du pycnomètre rempli d'eau
- $m_2$  : Masse en grammes du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

#### b) L'indice de réfraction

- **Définition**

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

- **Principe**

Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700 ; l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1.333 pour l'eau distillée.

#### c) La miscibilité à l'éthanol

Une huile essentielle est dite miscible à V volumes et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé à la température de 20 °C, lorsque le mélange de 1 volume de l'huile essentielle considérée avec V volumes de d'éthanol représente une phase homogène limpide et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre jusqu'à un total de 20 volumes.

#### d) Point de congélation

Le point de congélation d'une huile essentielle est la température constante ou maximale observée pendant la phase de la libération de la chaleur de solidification lorsque cette huile essentielle à l'état liquide est refroidie. Les huiles essentielles sont placées dans des tubes à essais à l'intérieur d'un congélateur accompagnées d'un thermomètre.

### 3) Calcule des indices chimiques

#### a) Indice d'acide :

- **Définition**

Il représente le nombre en mg d'hydroxyde de potassium nécessaire pour la neutralisation des acides libres dans un gramme d'huile essentielle. Il est calculé par la formule suivante:

$$I_A = 5.61 \times V/m$$

Ou :

- **5.61** : correspond à 0,1mole/l de KOH ;
- **m** : est la prise d'essai ;
- **V** : est le volume en ml de la solution KOH.

- **Protocole expérimental :**

Dans un Erlenmeyer on prépare une solution de **m** (mg) d'huile essentielle avec 25ml d'éthanol à 95% et 25ml d'éther et 5 goûte de phénolphtaléine. On neutralise la solution par une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.1M.

Le titrage se termine lorsque la couleur rose commence à apparaître et persiste pendant 15 s au moins, on note le volume (**V** en ml) de (KOH) qui cause ce changement de couleur.

**b) Indice d'ester**

- **Définition**

L'indice de saponification  $I_S$  est le nombre qui exprime en (mg) la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1 g de substance.

$$I_E = 28.05 \times (n_2 - n_1)/m$$

- **Protocole expérimental**

Dans une fiole de 250ml de verre munie d'un réfrigérant à reflux, on introduit la prise d'essai **m** (mg). On ajoute 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0.5 M et quelques billes de verre. Le réfrigérant est adaptée et chauffée à reflux pendant 30 mn. On ajoute 1ml de solution de phénolphtaléine et on titre immédiatement (alors que la solution est encore chaude) par l'acide chlorhydrique 0.5 M (**n<sub>1</sub>** ml d'acide chlorhydrique 0.5 M). On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions (**n<sub>2</sub>** ml d'acide chlorhydrique 0.5 M).

### II.3.4. Méthode d'analyse des huiles essentielles

Les huiles essentielles des différents échantillons sont analysées par la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) (Keravis., 1997 in Lahlou., 2004).

Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, elle est couramment utilisée pour l'identification des terpènes (Malecky., 2008).

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Cavalli., 2002). Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée

d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules (**Burgot., 2011**).

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse/charge.

En parallèle, une autre approche est souvent utilisée qui consiste à calculer les indices de Kovats de terpènes et comparer ces indices avec une base de données contenant les indices pour les terpènes identifiés. Les indices de Kovats sont les temps de rétention relatifs aux substances analysées par rapport à celles des alcanes (**Malecky., 2008**). La formule ci-dessous décrit le calcul des indices de Kovats à partir des temps de rétention des composés cibles et ceux des alcanes :

$$I=100 \left[ \frac{t_{R_i} - t_{R_z}}{t_{R_{(z+1)}} - t_{R_z}} + z \right]$$

Avec :

I= indice de Kovats,  $t_{R_i}$ = temps de rétention de l'échantillon i inconnue, z= nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui sort avant le composé inconnu et (z+1)= nombre d'atome de carbone de l'alcane qui a été élué après le composé inconnu (**Djellouli et al., 2015**).

### 1) Conditions opératoires de la CG/SM

L'analyse qualitative a été réalisée sur un chromatographe de type Perkin Elmer 600 couplé à un spectromètre de masse Perkin Elmer 600C, équipé d'une colonne capillaire Rtx-5MS de (60 m × 0,25 mm), l'épaisseur du film est de 0,25µm, opérant sous pression d'hélium avec un débit de 1 ml/min, et muni d'un système de détection spécifique quadripolaire, dans lequel le potentiel d'ionisation est fixé à 70 eV. Les températures de l'injecteur et la ligne de transfert MS ont été fixées à 250 et 220°C, respectivement (**Djellouli et al., 2015**).

La température de la colonne a été maintenue initialement à 60°C pendant 2 min, puis augmentée progressivement pour atteindre 125°C à une vitesse de 2°C/min, pendant 2 min, et finalement portée à 220°C à raison de 5°C/min pendant 2 min. 1µL des échantillons dilués dans l'éthanol 1:100 (v/v) ont été injectés manuellement en utilisant un mode split less.

L'appareil est lié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse des huiles essentielles sert à identifier les constituants de l'huile essentielle (Djellouli et al., 2015).

## 2) Identification des constituants

L'identification des constituants des huiles essentielles a été faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention, calculés par rapport à une série d'alcane ( $C_8$ - $C_{30}$ ), à la Co-injection des composés de référence mis à notre disposition au laboratoire ainsi qu'aux spectres de masse des constituants de deux bibliothèques Wiley et de NIST 5 (le National Institute of Standards and Technology) (Djellouli et al., 2015).

### II.3.5. Étude de l'activité antimicrobienne

#### II.3.5.1. Préparation et identification des souches microbiennes

Les souches microbiennes fournies sont déjà identifiées (souches de référence) et afin de s'assurer de leurs puretés, un ensemencement sur les milieux de sélection nous a semblé nécessaire.

Les souches bactériennes sont mise en culture dans du bouillon nutritif, à une température de 37°C, durant 18 à 24h et les souches fongiques sont mise culture Par la suite durant 72h, nous les avons ensemencées sur les milieux de sélection suivants :

- Chapman et Baird Parker pour *Staphylococcus aureus*
- La gélose au sang cuit pour *Listeria monocytogenes*
- Hektoen pour *Escherichia coli*.
- Salmonella-Shigella (SS) pour *Salmonella typhi*.
- King A et King B pour *Pseudomonas aeruginosa* .
- PDA ((Potato Dextrose Agar) pour les champignons

Pour purifier les cultures bactériennes (obtention de cultures ne contenant qu'un seul type de germe), des repiquages successifs ont été effectués sur les deux milieux solides.

#### II.3.5.2. La mise en culture

Les principaux milieux de culture utilisés sont : la gélose Mueller Hinton et le Bouillon Nutritif (pour les bactéries) et le milieu PDA (pour les champignons).

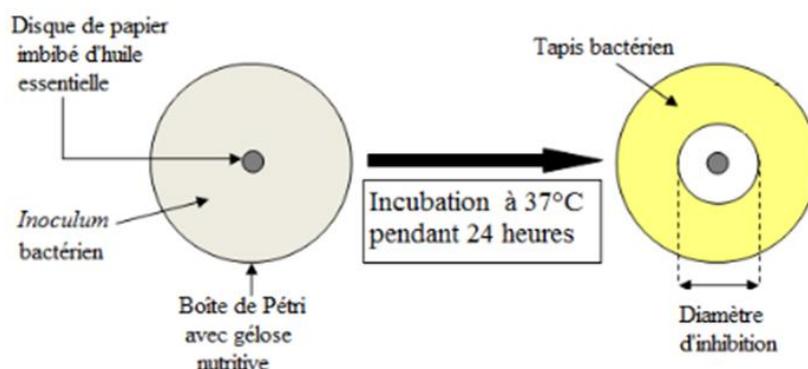
#### II.3.5.3. Évaluation de l'activité antibactérienne

Avant les tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de chaque plante, qui ont été réalisés avec les deux méthodes cité au-dessous un antibiogramme semblait nécessaire pour déterminer ou non la résistance des souches testées :

1. Par la méthode de diffusion (méthode de Vincent), dans une première étape.
2. Dans la deuxième étape, par la méthode de dilution, en milieu liquide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB) et les concentration minimales fongicides (CMF), pour l'huiles actifs.

#### II.3.5.4. Détermination de l'activité par la méthode de diffusion (méthode de Vincent)

Pour tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des deux plantes *Cotula cinerea* et *Warionia saharae*, nous avons adopté la technique de diffusion standardisée dans le rapport de l'OMS (1977 in Rios *et al.*, 1988) et Bauer *et al.*, (1996). C'est la méthode d'aromatogramme par diffusion, à partir de disques imprégnés par des huiles essentielles, technique inspirée de l'antibiogramme comme le montre la **Figure 24**. Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque (Billerbeck., 2007).



**Figure 24 :** Principe de la méthode de diffusion par disque (Guinoiseau., 2010).

- **Le mode opératoire**

Une suspension de chaque germe est préparée dans de l'eau physiologique stérile et ajustée à  $10^8$  cellules/ml (entre 0.08 à 0.1 DO). A partir de chaque suspension, 100µl a été étalée sur une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre ; des écouvillons stériles ont été utilisés pour l'ensemencement en surface du milieu gélosé Muller Hinton.

Une fois les milieux gélosés ensemencés, des disques de papier Wattman N°= 3 stériles de 6 mm de diamètre (Durmaz *et al.*, 2006) sont déposés sur le milieu de culture. Nous avons imbibé chaque disque d'un volume fixe de 10µl de chaque huiles essentielles; l'opération a été répétée 3 fois pour chaque dilution (3 disques de la même dilution par boîte).

Une Préculture a été faite à 4°C pendant 1 heure pour avoir une bonne diffusion de

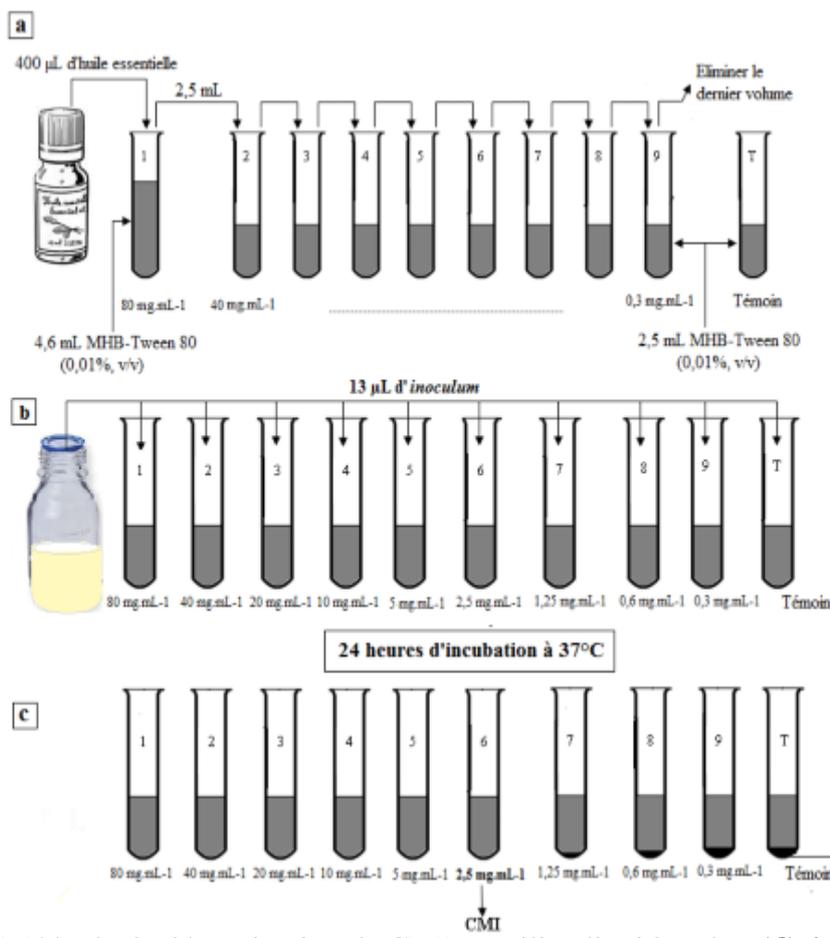
l'huile essentielles, puis les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24 h, pour les bactéries (Belhattab *et al.*, 2004) et 120 h pour champignons (Muanda *et al.*, 2011). A la fin de l'incubation, nous avons noté l'activité des huiles essentielles, en mesurant la zone d'inhibition, claire, autour des disques, à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats de La lecture sont exprimés selon trois niveaux d'activité : résistant ( $D \leq 6$  mm), intermédiaire ( $6 \text{ mm} \leq D \leq 13\text{mm}$ ) et sensible ( $D > 13\text{mm}$ ) (Billerbeck., 2007).

### II.3.5.5. La détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

Après avoir évalué l'activité par la méthode de diffusion, nous avons procédé à la détermination des CMI de huile essentielle de *Cotula cinerea*, révéle active, selon la méthode de la dilution en milieu liquide comme le montre la **Figure 25**, décrite par Ericsson et Sherris., (1971) in Senthilkumar *et al.*, (2009).

- **Le mode opératoire**

Pour préparer les dilutions des huiles essentielles, testées dans cette partie du travail, une solution mère a été préparée préalablement, en faisant dissoudre l'huile essentielle de la plante dans une solution de DMSO 5% (afin de réaliser des dilutions successives). Pratiquement, nous avons cultivé les bactéries sur du bouillon nutritif.



**Figure 25 :** Méthode de détermination de CMI en milieu liquide selon (Guinoiseau., 2010).

Des volumes constants de milieu de culture liquide (2,4 ml) ont été répartis dans des tubes à essai. Pour obtenir une charge de  $10^5$  cellules/ml, nous les avons inoculés avec une suspension bactérienne et fongique.

Par la suite, nous avons ajouté, dans les tubes, les dilutions d'huile à tester (concentrations décroissantes de 198.5 à 1.55 mg /ml pour l'huile de *Cotula cineria*; le volume injecté dans chaque tube étant de 600 $\mu$ l. Un tube servant de témoin négatif est ensemencé sans extrait.

Les tubes à essai, ainsi préparés, sont incubés pendant 24h à 37°C et 120h pour les champignons. Après l'incubation, les résultats sont notés, en observant, à l'œil nu, des tubes agités manuellement. Ainsi, nous avons déterminé la CMI (la concentration la plus faible engendrant une inhibition de la croissance, en comparaison avec le témoin négatif).

Après avoir révélé la CMI, nous avons procédé à la détermination de la CMB et la CMF (la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance n'est observée après repiquage).

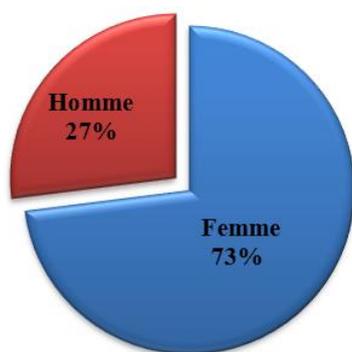
Un prélèvement à l'anse calibrée a été réalisé dans chacun des tubes ne présentant aucune culture visible (limpides). Chaque prélèvement a été déposé en stries parallèles sur MH gélosé et les boîtes ensemencées ont été incubées pendant 24 heures à 37°C.

Une fois l'incubation est terminée, la lecture de la densité des colonies obtenues, avec chacune des dilutions de l'inoculum, a été effectuée, à l'œil nu. Grâce à ces résultats, la CMB et la CMF sont déterminés.

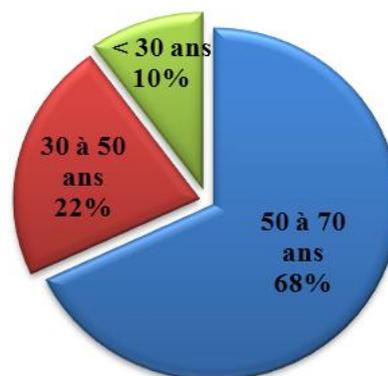
*Partie III*  
*Résultats et discussion*

### III.1. Résultats de l'enquête ethnobotanique

Parmi les personnes interrogées, 86 % d'individus ont recours aux plantes médicinales pour leurs soins. Ce sont les femmes qui ont le plus recours aux plantes avec un pourcentage de 73% contre 27% pour les hommes comme le montre la **Figure 26**. La **Figure 27** montre que la médication par les plantes dépend également de l'âge. C'est la classe d'âge entre 50 et 70 ans qui représente le pourcentage le plus élevé (68%) de personnes s'adonnant aux plantes médicinales ; alors que 22% de personnes utilisant les plantes ont un âge compris entre 30 et 50 ans et 10% des utilisateurs ont un âge inférieur à 30 ans.



**Figure 26 :** Utilisation des deux plantes en fonction du Sexe.



**Figure 27 :** Utilisation des deux plantes en fonction de l'Age.

L'enquête ethnobotanique menée dans la région de Béchar au sud-ouest algérien, montre que les deux espèces végétales (*Cotula cinerea*, et *Warionia saharae*) sont très utilisées en médecine traditionnelle de la région, sous différentes formes de préparations médicamenteuses, dans la lutte contre diverses maladies telles que : Coliques, Toux, Diarrhée, Migraines, Maux de tête et désordres digestifs pour toutes les parties de la plante *Cotula cineria* (Djellouli et al, 2013). Seule les feuilles de la plante *Warionia saharae* sont utilisées pour le traitement des maladies telles que : gastro-intestinales, rhumatismes comme anti-inflammatoire, l'ictère et Arthrite Rhumatoïde, comme on peut l'utilisé comme calmant ou drogue Suite à la maladie traitée.

Les résultats de notre enquête ethnobotanique sur les deux plantes étudiées corroborent avec les résultats d'enquêtes ethnobotaniques, obtenus par d'autres auteurs en Algérie et au Maroc.

*Cotula cinerea* (Del), a été signalée dans une étude réalisée par Maiza et al., (1996), comme plante médicinale a fort usage thérapeutique, très connu par la population local de

région du Sahara septentrional Algérien, pour le traitement de plusieurs maladies tel que : l'insolation, les coliques, la toux, le refroidissement et les maladies broncho-pulmonaires. D'autre part **Ould elhadj & al., (2003)**, ont révélée dans une étude ethnobotanique sur les plantes médicinales de la région du Sahara septentrional est de l'Algérie, que cette plante est utilisée pour le traitement des maladies : les Colique, diarrhée, toux, refroidissement et les maladies broncho-pulmonaire. Au Maroc plusieurs études ont révélés que la plante *Cotula cinerea* est l'une des plantes médicinales les plus utilisée par la population locale ou les tradipraticiens en médecine traditionnelle Marocaine. L'une des plus importantes études est celle motionné dans le livre de **Bellakhdar J., (1997)** sur la pharmacopée marocaine traditionnelle qui a signalé que cette plante est utilisée pour le traitement des coliques, toux, diarrhée, le refroidissement broncho pulmonaires et troubles digestifs. La deuxième et celle de **El Rhaffri et al, (2002)**, sur les plantes de la région de sud-est du Maroc, qui a porter que les maladies traitées par cette plante sont : Le Désordres digestifs, la Migraine, les maux de tête et la Fièvre.

*Warionia saharae (Benth & Coss)* a été mentionné dans une étude réalisée par **Cheriti et al., (2013)**, comme plante médicinale utilisé par la population local de sud-ouest algérien pour le traitement de : Tractus Gastro intestinal, Ictère et comme anti inflammatoires. Au Maroc, cette plante et utilisé pour le traitement de : Arthrite Rhumatoïde, Gastro-entérite, Inflammation de l'utérus, Froids et Rhume, les Douleurs cardiaques, Anti-inflammatoires, affections gastro-intestinales et contre les crises épileptique (**El Rhaffri et al., 2002, Bellakhdar., 1997 et Bellakhdar et al., 1986**).

En comparant nos résultats avec d'autres études ethnobotanique ou pharmacologiques menées en Algérie ou bien au Maroc, nous avons remarqué qu'il y a une convergence entre les résultats obtenus par notre enquête et les résultats des autres enquêtes comme le montre le **tableau 03**. Cette convergence d'usages thérapeutiques traditionnels résulte probablement du fait que les nomades qui se déplacent entre les deux pays depuis toujours, transmettent au cours de leurs déplacements leurs savoirs aux populations locales (**Maiza et al, 1996**), ou probablement cette convergence est due à la forte émigration des algériens dans la période coloniale (la guère de révolution) vers le territoire marocain (**Djellouli et al, 2013**).

**Tableau 03:** Utilisation traditionnelles des eux plantes étudiées selon d'autres études ethnobotaniques dans différents régions.

Plantes	Région d'études	Utilisation traditionnelles	Notre enquête Au Sud-ouest Algérien	Références correspondant
<i>Cotula cinerea</i> (Del)	Sahara septentrional (Algérie)	Insolation, <b>Coliques, Toux</b> , Refroidissement Broncho-pulmonaires	<b>Coliques, Toux, Diarrhée, Migraine, Maux de tête, Désordres digestifs.</b>	(Maiza. K & al., 1996)
	Sahara septentrional est (Algérie)	<b>Colique, diarrhée, Toux</b> , Refroidissement broncho-pulmonaires		(Ould elhadj & al., 2003)
	(Maroc)	<b>Coliques, Toux, Diarrhée</b> , le Refroidissement Broncho pulmonaires et <b>Troubles digestifs</b>		(Bellakhdar J., 1997)
	Sud-est du Maroc (Maroc)	<b>Le Désordres digestifs, la Migraine, les maux de tête et la Fièvre</b>		(El Rhaffri et al., 2002)
<i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss)	Sud-ouest algérien (Algérie)	Tractus <b>Gastro intestinal, Ictère et anti inflammatoires</b>	<b>Gastro-intestinales, Rhumatismes, l'Ictère Froids et Rhume, Calmant Arthrite Rhumatoïde et anti inflammatoires</b>	(Cheriti et al., 2013)
	Sud-est du Maroc (Maroc)	<b>Arthrite Rhumatoïde, Gastro-entérite</b> , Inflammation de l'utérus, <b>Froids et Rhume</b> , Douleurs cardiaques		(El Rhaffri et al., 2002)
	Sud marocain (Maroc)	<b>Anti-inflammatoires</b> , affections <b>gastro-intestinales</b> et contre les crise épileptique		(Bellakhdar., 1997 et Bellakhdar et al., 1986)

### III.2. Résultats du criblage phytochimique

Les effets thérapeutiques des deux plantes étudiées sont probablement due ou induits par divers composés chimiques (*Alcaloïdes, Flavonoïdes, Tèrpenoïdes, Saponosides, Stéroïls* et *Tanins ...etc.*) qui constituent la base scientifique de l'utilisation thérapeutique traditionnelle des plantes médicinales. De ce faite, un criblage phytochimique est nécessaire pour identifier les différents groupes chimiques responsables de ces effets.

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des parties aériennes des deux plantes étudiées *Cotula cinerea (Del)* et *Warionia saharae (Benth & Coss)* pour cette étude, a permis de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques représentés dans le **Tableau 04**:

**Tableau 04:** Résultats du criblage phytochimique réalisé sur les deux plantes étudiées.

<i>Produits naturelles</i>	<i>Cotula cineria (Del)</i>	<i>Warionia saharae (Benth &amp; Coss)</i>
<i>Alcaloïdes</i>	+	++
<i>Saponosides</i>	++	++
<i>Terpènes et Stéroïls insaturés</i>	+++	+++
<i>Tanins</i>	+	++
<i>Flavonoïdes</i>	++	++
<i>Stéroïdes</i>	++	++
<i>Cardenolides</i>	++	++

(+) : faible présence ; (++) : moyenne présence et (+++) : forte présence

Tous nos essais chimiques étaient positifs comme le montre le tableau si dessus :

- **Les Alcaloïdes et Les tanins** : sont en faible présence dans la plante *Cotula cineria* et moyenne dans la plante *Warionia saharae*.
- **Les Saponosides, les Flavonoïdes, les Stéroïdes et Cardenolides:** Sont en Moyenne présence dans les deux plantes
- **Les Stéroïls insaturés et Terpènes** : sont en quantités remarquables dans les deux plantes.

Notre étude phytochimique préliminaire effectuée sur les extraits des parties aériennes des deux plantes étudiées, confirme la présence des Saponosides, Flavonoïdes, Stéroïdes, Cardenolides, Alcaloïdes et tanins, Stéroïls insaturés et Terpènes. Ces groupes chimiques très

connus pour leurs nombreuses vertus médicinales et d'effets biologiques (antimicrobiens, anti-inflammatoires activités antioxydants anti-inflammatoires, antivirales...etc.), pourraient justifier l'utilisation traditionnelle de ces deux plantes (**Djellouli et al., 2015**). En revanche, nos résultats sont contradictoires au niveau de la présence ou de l'absence d'alcaloïdes, tanin et stéroïdes (**Abdenbi et al., 2014** et **Cheriti et al., 2013**). En effet, dans une recherche phytochimique préliminaire sur 11 plantes médicinales du Sahara algérien effectuée par **Cheriti et al., (2013)** en utilisant les mêmes tests de criblage, a révélé la présence des flavonoïdes en quantités moyennes, les saponosides et les alcaloïdes en quantités faibles et l'absence des Tanins, Cardinolides, Stéroïdes et les Terpènes et Stérols insaturés dans les extraits de la plante *Cotula cinerea*. Par contre **Abdenbi et al., (2014)** ont révélé une forte présence des Saponosides, Flavonoïdes, Tanins, Stérols et Terpènes et l'absence des alcaloïdes dans un screening phytochimique réalisé sur la même plante. Pour la plantes *Warionia saharae*, **Cheriti et al., (2013)** ont signalé la présence des Flavonoïdes et Saponosides en quantités remarquable, les Cardinolides en quantité moyenne, les Terpènes et Stérols insaturés en quantité faible et l'absence des tanins, des alcaloïdes et les stéroïdes.

### III.3. Résultats de l'extraction des huiles essentielles

- L'huile essentielle extraite de la plante *Cotula cinerea* (*Del*) à un aspect liquide un peu limpide, de couleur verte comme le montre la **Figure 28** et d'odeur aromatique agréable, avec un fond épicée.
- L'huile essentielle extraite de la plante *Warionia sahara* (*Coss*) a un aspect visqueux, de couleur marron comme le montre la **Figure 29** et avec une odeur aromatique agréable très forte. Les différents caractères signalés sont portées dans le tableau 05.



**Figure 28:** Huile essentielle de la plante *Cotula cinerea* (*Del*).



**Figure 29:** Huile essentielle de la plante *Warionia saharae* (*Benth & Coss*).

### III.3.1. Calcul des rendements

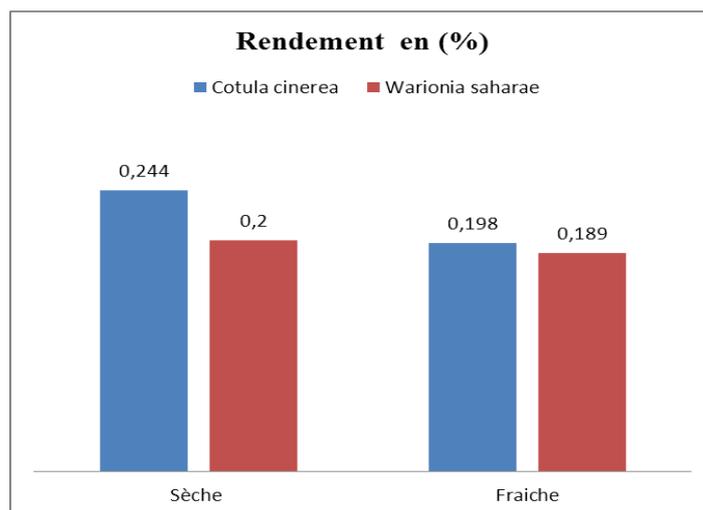
Le rendement est le rapport de la quantité d'huile recueillie après distillation sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage. Les quantités d'huile essentielle proviennent du cumul d'au moins cinq distillations.

Les résultats de calcul de rendement recueilli lors de l'hydrodistillation à partir des deux plantes sèches et fraîches sont représentés dans le **Tableau 05**.

**Tableau 05** : Rendement en huiles essentielles extraites des deux plantes *Cotula cinerea* (Del) et *Warionia saharae* (Benth & Coss).

<i>Rendement en huiles essentielles</i>					
<i>extraites en (%)</i>					
<i>Plantes</i>	<i>Etat de la plante</i>		<i>Caractères physiques et organoleptiques</i>		
	<i>Sèche</i>	<i>Fraiche</i>	<i>Odeur</i>	<i>Couleur</i>	<i>Etat physique</i>
<i>Cotula cinerea</i> (del)	0.244	0.198	<i>Odeur épicée</i>	<i>Verte</i>	<i>Liquide</i>
<i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss)	0.200	0.162	<i>Agréable très forte</i>	<i>Marron</i>	<i>Visqueux</i>

A la lumière de ces résultats, on remarque que le rendement en huiles essentielles extraites de la plante *Cotula cinerea* est obtenu avec les rendements les plus élevés 0.244 % et en utilisant la masse végétale sèche et 0.198%, en utilisant la masse végétale fraîche. Les valeurs les plus faibles des rendements sont ceux de la plantes *Warionia sahara* quel que soit l'état de la matière végétale utilisé (sèche ou fraîche) comme le montre l'histogramme sur la **Figure 30**. Cela nous mène à constater que l'état de la matière végétale affecte grandement l'extraction et le rendement en huiles essentielles.



**Figure 30** : Rendement en huiles essentielles extraites des deux plantes étudiées

Nous avons remarqué aussi, que les rendements obtenus ne coïncident pas avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont procédé par la même technique d'hydrodistillation. En effet, les rendements obtenus pour *Cotula cinerea* sont largement inférieurs au rendement (2%), obtenu de la même espèce collectée dans la région de kenadsa à 18 km au sud de la ville de Béchar (**Abdenebi et al., 2014**), et (**Chouikh A & al., 2015**) qui ont obtenu des rendements de 0.0801% et 0.391% respectivement pour la même plante *Cotula cineria* en période de la floraison et en période de la fructification. Pour la plante *Warionia saharae* (**YAKOUBI et al., 2014**) ont obtenu un rendement de 0.5% et (**Essaqui et Benaissa., 2013**) ont obtenu un rendement de 0.35% et (**Sellam et al., 2014**) eux aussi ont obtenu un rendement différent égal à 1.1%. Cette différence en rendement est probablement due à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat ou bien à la simplicité de notre dispositif d'hydrodistillation.

Selon certains auteurs, Cette différence de rendement en huiles essentielles varie suivant diverses conditions : la méthode employée, les parties végétales utilisées et les produits et réactifs employés pendant l'extraction, l'environnement, le géotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte de cette plante, le degré de séchage, les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, présence de parasites, de virus et mauvaises herbes (**Ben Marzoug et al., 2011**, **Ghasemi Pirbalouti et al., 2015**, **El Akhal et al., 2014**).

### III.4. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles analysées ont été déterminées selon les normes de l'association française de normalisation (Afnor, 1989). Le contrôle de l'huile essentielle par les caractéristiques physiques et chimiques permet de mettre en évidence la qualité de cette huile (Haddouche et al; 2009). Les caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles des deux plantes étudiées avoisinent dans l'ensemble les normes de commercialisation des huiles essentielles comme le montre le **Tableau 06**.

**Tableau 06** : Caractéristiques physico-chimiques des deux huiles essentielles étudiées.

<i>Caractères physico-chimiques</i>	<b>Huiles essentielles</b>	
	<i>Cotula cinerea</i>	<i>Warionia saharae</i>
<b>Caractère physique</b>		
<i>Indice de réfraction</i>	1,479	1,463
<i>Densité relative à 20°C</i>	0,798	0.886
<i>Miscibilité à l'éthanol</i>	2V/1V	3V/2V
<b>Caractère chimique</b>		
<i>Indice d'acide</i>	0.679	0.93
<i>Indice d'ester</i>	17.72	14.13

#### III.4.1. Indices physiques

##### 1. Densité relative ( $d_{20}$ )

La densité d'une huile est le rapport de la masse d'un certain volume d'une huile à 20°C, à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C. La densité des huiles essentielles est inférieure à celle d'eau.

Les valeurs des densités relatives se limitent entre 0,7986 pour l'huile de *Cotula cineria* et 0,8124 pour l'huile de *Warionia saharae*. D'après ces résultats on peut dire que l'huile essentielle de la plante *Warionia saharae* est plus dense que celle de la plante *Cotula cineria*.

##### 2. Indice de réfraction ( $I_r$ )

Les indices de réfraction mesurés sont supérieurs à l'indice de réfraction de l'eau à 20°C (1,333). Chaque huile essentielle a son indice de réfraction spécifique. L'indice de réfraction de l'huile essentielle de la plante *Cotula cineria* est de 1,479 ; pour la plante *Warionia saharae* il est de 1,463. On constate que l'huile de *Cotula cineria* présente un

indice de réfraction légèrement supérieur à celui de la plante *Warionia saharae*, celui-là est dû à la différence dans la composition chimique des huiles essentielles spécialement la présence de monoterpènes oxygénés. Selon **Boukhatem et al., (2010)**, un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. En comparant ces deux valeurs avec les valeurs d'indices d'autres huiles essentielles telle que : Eucalyptus: 1.458 à 1.470 ; Lavande : 1.463 à 1.468 et Thym : 1.495 à 1.505. En peu considérés que Ces valeurs correspondent aux normes.

### 3. Miscibilité à l'éthanol ( $M_E$ )

La miscibilité à l'éthanol de l'huile essentielle de la plante *Cotula cineria* est d'un volume d'huile essentielle pour deux volumes d'éthanol (1V/2V) et la miscibilité est d'un volume d'huile essentielle pour trois volumes d'éthanol (2V/3V) pour l'huile essentielle de la *Warionia saharae*.

Donc l'huile essentielle de la plante *Cotula cineria* est plus miscible que l'huile essentielle de la plante *Warionia saharae*. Ces variations sont dues probablement à la différence de densité des deux huiles essentielles.

#### III.4.2. indices chimiques

1. L'indice d'acide et l'indice d'ester de l'huile essentielle de *Cotula cineria* sont respectivement 0.679 et 17.72.
2. L'indice d'acide et l'indice d'ester de l'huile essentielle de *Warionia saharae* sont respectivement 0.93 et 14.13.

Un indice d'acide inférieur à deux, est une preuve de bonne conservation de l'huile. Les indices d'acide et d'ester déterminés montrent peu d'acides libres dans les deux huiles essentielles testés ce qui signifie que ces huiles ne renferment pas assez de composés saturés.

Les caractéristiques physicochimiques avoisinent dans l'ensemble les normes françaises de commercialisation des huiles essentielles (**Afnor., 2000**). La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques : GC/SM, ces dernières, sont souvent utilisées comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles, elles ont été employées pour identifier qualitativement les huiles essentielles des feuilles de la réglisse (**Chouitah., 2012**).

### III.5. Analyse GC/MS des deux huiles essentielles étudiées

L'objectif principal de l'analyse des huiles essentielles de la partie aérienne des deux plantes provenant de la région de sud-ouest algérien, est d'identifier l'ensemble de leurs constituants par la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse et la spectroscopie de masse. Les résultats des analyses des huiles essentielles des deux Asteraceae sont présentés sous forme de chromatogrammes. Ces analyses révèlent le nombre important de produits contenus dans les deux huiles essentielles.

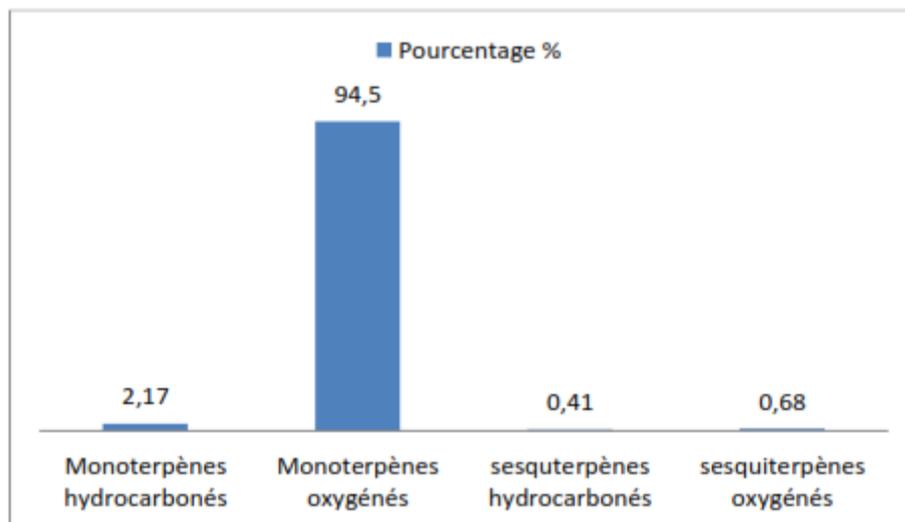
La surface de l'aire de chaque pic représente le pourcentage du composé par rapport à la totalité des composés et le temps de rétention de chaque constituant nous renseigne sur la nature du composé. Dans les deux chromatogrammes, le temps de rétention varie selon la nature du composé. Plus le poids moléculaire augmente, plus le temps de rétention augmente.

Après le calcul des indices de rétention et dépouillement des chromatogrammes obtenus, les identifications des composés chimiques sont regroupées dans les tableaux **08** et **10** dont les temps de rétention, les formules et les indices de rétention de chaque constituant sont reportés.

Au premier coup d'œil sur les deux chromatogrammes, il apparaît que les deux huiles essentielles des deux plantes sont très complexes par la présence d'un grand nombre de constituants comme la montre les deux chromatogrammes **Figure 33** et **Figure 38**. Les premiers composés identifiés sont les monoterpènes et les seconds sont les sesquiterpènes avec une absence totale des diterpènes chez les deux huiles essentielles des deux plantes étudiées.

#### III.5.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* (Del)

L'analyse de l'huile essentielle de *Cotula cineria* par GC/MS, nous a permis d'identifier 33 composés représentant 98.66% des constituants de l'huile comme le montre le tableau 08. L'huile est dominée par la présence des monoterpènes oxygénés (95.40%) suivie par les monoterpènes hydrocarbonés (2.17%), les sesquiterpènes oxygénés (0.68%) et les sesquiterpène hydrocarbonés (0.41%) comme le montre l'histogramme sur la **Figure 31**.



**Figure 31:** Histogramme représentant la teneur des différents Terpénoïdes dans l'huile essentielle de *Cotula cinerea* (Del).

Les monoterpènes oxygénés sont repartie selon leurs groupes fonctionnelles en cinq groupes chimiques représentés dans le **Tableau 07**: quatre alcools et phénols (Carvacrol, Trans-Carveol, Trans- Piperitol et linalool), un aldéhyde ((E)-Citral), trois esters (Bornyl acetate, Geranyl acetate et (Z)-Sabinyl acetate), deux éthers (Thymol methyl ether et Limonene epoxide Cis-) et un cétone (Carvone) représentant 31.97%, 24.01%, 2.93%, 33.30% et 3.06% de la composition chimique de cette huile essentielles.

Les monoterpènes hydrocarbonés sont représenté par :  $\alpha$ -Fenchene,  $\alpha$ -Phellandrene, Limonene, (E)- $\beta$ -Ocimene, (Z)- $\beta$ -Ocimene, Cis-Dihydromultifidene et Terpinolene

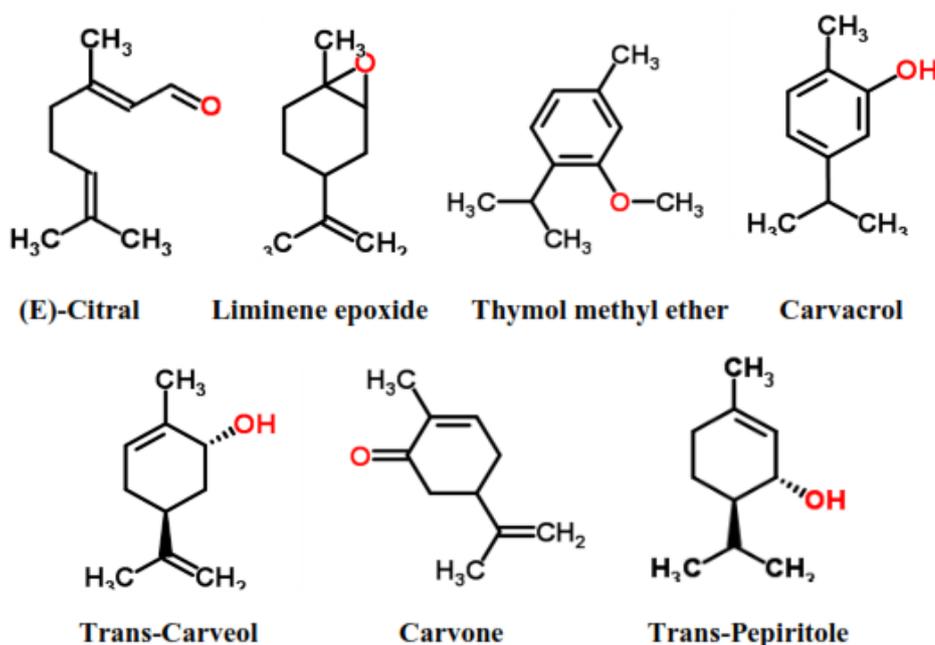
Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont représenté par : B-Elemene, Trans-caryophyllene, Caryophyllene B, Bicyclogermacrene et Germacrene B.

Les sesquiterpènes oxygénés sont repartie en deux groupes chimiques: cinq alcools ((Z)-Nerolidol, trans-Nirolidol, Scapanol,  $\alpha$ -Bisabolol, Farnesol (isomer 2) et le Bisabolol) représentant 0.51% de la composition chimique de l'huile est un ester le Geranyl isopentanoate 0.11%.

**Tableau 07:** Différents classes des composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *Cotula cinerea*.

Classe de composés	Nom des composés identifiés	Pourcentage (%)
Monoterpènes Hydrocarbonés	$\alpha$ -Fenchene, $\alpha$ -Phellandrene, Limonene, (E)- $\beta$ -Ocimene, (Z)- $\beta$ -Ocimene, Cis-Dihydromultifidene et Terpinolene	2.17
Monoterpènes Oxygénés		95.40
Alcools et phénols	Carvacrol, Trans-Carveol, Trans- Piperitol et linalool	31.97
Aldéhyde	(E)-Citral	24.01
Ester	Bornyl acetate, Geranyl acetate et (Z)-Sabinyl acetate	2.930
Ether	Thymol methyl ether et Limonene epoxide Cis-	33.30
Cétone	Carvone	3.06
Sesquiterpènes Hydrocarbonés	B-Elemene, Trans-caryophyllene, Caryophyllene B, Bicyclogermacrene et Germacrene B	0.41
Sesquiterpènes Oxygénés		0.68
Alcools	(Z)-Nerolidol, trans-Nirolidol, Scapanol, $\alpha$ -Bisabolol, Farnesol (isomer 2) et le Bisabolol oxide A.	0.57
Ester	Geranyl isopentanoate	0.11

Les composés majoritaires sont : (E)-citral (24.01%), Limonene epoxide cis- (18.26%), Thymol methyl ether (15.04%), Carvacrol (15.03%), Trans-carveol (13.79%), Carvone (3.06%) et Trans-piperitol (2.54%) représentés dans la **Figure 32**.

**Figure 32:** Composés majoritaires de l'huile de *Cotula cineria* (Del).

La comparaison de nos résultats avec des travaux antérieurs menés sur la même espèce *Cotula cinerea* (Del) à montrer que l'huile de cette espèce est toujours dominée par les monoterpènes oxygénés suivie par les monoterpènes hydrocarbonés et par des quantités toujours faibles de sesquiterpènes quel que soit la région d'étude, même si il existe de grandes différences dans la composition chimique de ces huiles essentielles d'une région à l'autre. **Bouziane et al., (2014)** ont signalé que l'huile essentielle de *cotula cinerea* collectée au nord-est de la ville de Ouargla est dominée par la présence des monoterpènes oxygénés (42%) suivie par les monoterpènes hydrocarbonés (30%), les sesquiterpènes oxygénés et les sesquiterpène hydrocarbonés représentent tous les deux (4%) avec le **camphre, l'eucalyptol et la thujone** sont donnés leurs pourcentages comme composés majoritaires. **Chouikh & al., (2015)** ont mené une étude portant sur l'huile essentielle de cette espèce collectée dans la région de oued Souf au sud-est algérien, Dans l'analyse chromatographique, ils ont révélé l'identification de 22 constituants volatils en période de floraison avec **3-Carène (30.99%), Thujone (21.73%), Santolina triene (18.58%) and Camphor (6.21%)** et 21 composants en période de fructification avec le **3-Carène (15.90%); Eucalyptol (15.13%); Santolina triene (13.38%) et Camphor (7.49%)** comme composés majoritaires. Et que le pourcentage des constituants majoritaires change d'une période à l'autre. **El Bouzidi et al., (2011) et Kasrati et al., (2015)** ont rapporté que l'huile essentielle des parties aériennes de l'Astéracée *Cotula cinerea* (Del) collectée au sud marocain, analysée par (CG/SM), a révélé 24 composants volatils dont les dominants sont les monoterpènes oxygénés (81.9%) suivie par les monoterpènes hydrocarbonés (14.7%) et les sesquiterpènes en quantités négligeables (0.5%), les composés majoritaires étaient **trans-thujone (41.4%), cis-Verbenyl acetate (24.7%), 1,8-cineole (8.2%) and camphor (5.5%)**.

Au point de vue chémotypes, de cette étude comparative sur la composition chimique de l'huile essentielle de la plante *Cotula cineria* (Del) et ceux de la littérature, on peut distinguer :

1) la présence de trois chémotypes en Algérie : Le chémotype de Ouargla à **camphre, l'eucalyptol et la thujone** comme composés majoritaires. Le chémotype de sud est algérien à **3-Carène (30.99%), Thujone (21.73%), Santolina triene (18.58%) et Camphor (6.21%)** et Le chémotype de la région sud-ouest algérien à **(E)-citral (24.01%), Limonène époxyde cis- (18.26%), Thymol méthyl éther (15.04%), Carvacrol (15.03%), Trans-carveol (13.79%)** comme composés majoritaires.

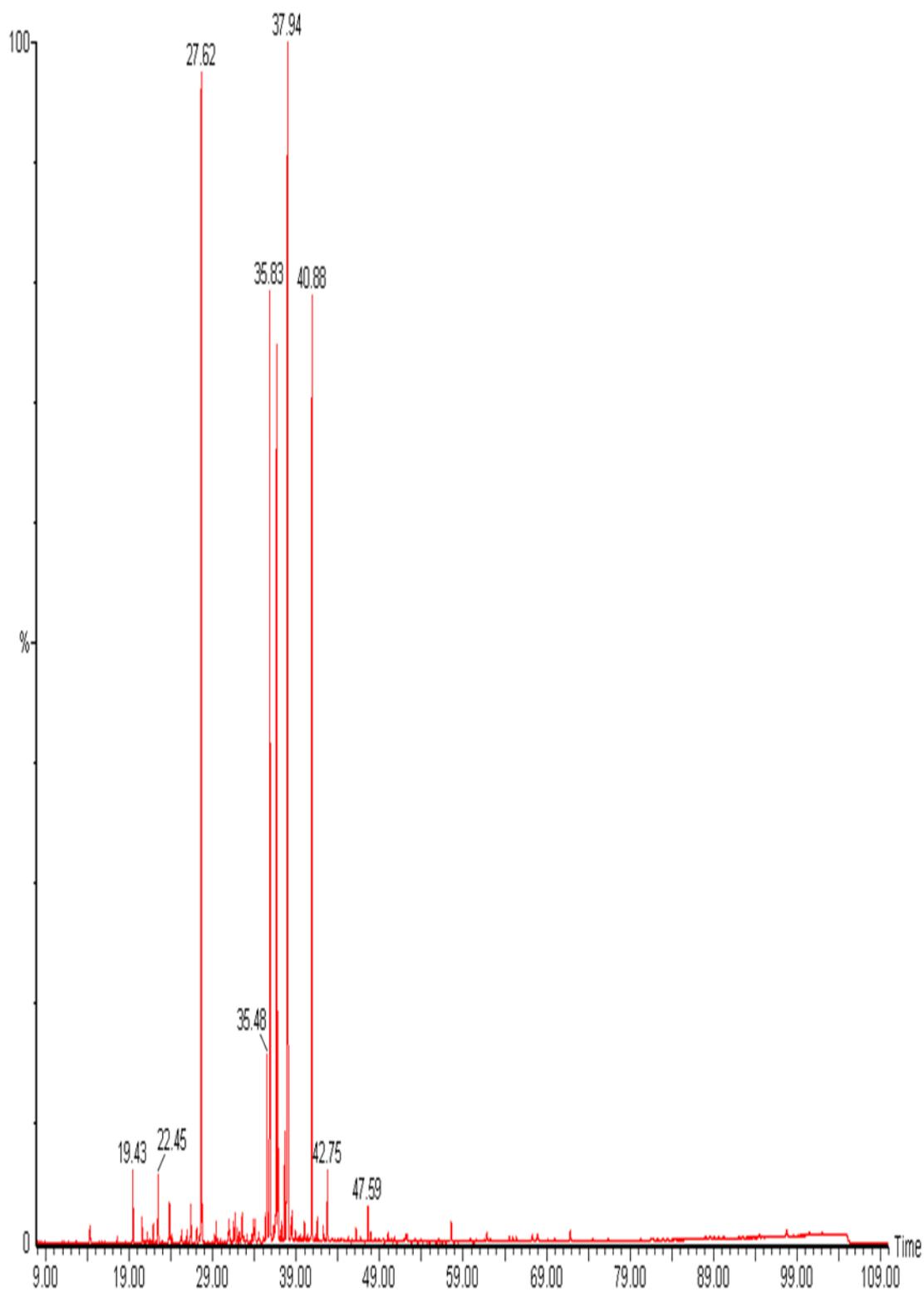
2) la présence d'un seul chémotype au sud Marocain à **trans-thujone (41.4%), cis-Verbenyl acetate (24.7%), 1,8-cineole (8.2%) et Camphor (5.5%)**.

Les huiles essentielles citées par ces auteurs sont de type chimique différent de notre échantillon du point de vu composés majoritaires. Cette différences qualitatives et quantitatives de la composition chimique des huiles essentielles pourrait être attribués à plusieurs facteurs comme l'emplacement géographique, les effets climatiques, la saison des récoltes, la nature du sol, l'âge des plantes (jeune ou adulte), l'état de la matière végétale utilisé (sèche ou fraîche), le temps de la collecte et le chemotype et la technique d'extraction (Ben Marzoug et *al.*, 2011 et Pirbalouti et *al.*, 2015).

**Tableau 08:** Composition chimique de l'huile essentielles de *Cotula cinerea* (Del).

No	RT	Name of Compounds	Formule	Area %	KI
01	10,93	Unknown	-	0,02	912,07
02	14,28	$\alpha$ -Fenchene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,26	958,09
03	17,54	$\alpha$ -Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,08	1002,44
04	19,43	Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,98	1024,47
05	20,52	(E)- $\beta$ -Ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,41	1037,17
06	21,14	(Z)- $\beta$ -Ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,14	1044,40
07	21,86	Cis-Dihydromultifidene	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub>	0,25	1052,79
08	<b>22,45</b>	<b>(Z)-Sabinyl acetate</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>1,18</b>	1059,66
09	23,80	Terpinolene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,05	1075,39
10	24,10	Linalool oxide II (pyran)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	0,13	1078,89
11	26,39	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,61	1105,53
12	<b>27,62</b>	<b>Limonene epoxide Cis-</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O</b>	<b>18,26</b>	1119,73
13	<b>35,48</b>	<b>Trans- Piperitol</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O</b>	<b>2,54</b>	1210,91
14	<b>35,83</b>	<b>Thymol methyl ether</b>	<b>C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O</b>	<b>15,04</b>	1215,10
15	<b>36,64</b>	<b>Trans-Carveol</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O</b>	<b>13,79</b>	1224,82
16	<b>36,80</b>	<b>Carvone,</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O</b>	<b>3,06</b>	1226,73
17	<b>37,94</b>	<b>(E)-Citral</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O</b>	<b>24,01</b>	1240,40
18	<b>40,88</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O</b>	<b>15,03</b>	1275,65
19	<b>42,75</b>	<b>Bornyl acetate</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>1,15</b>	1298,08
20	47,59	Geranyl acetate ,	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,60	1359,61
21	50,01	$\beta$ -Elemene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,15	1390,44
22	50,78	Bornyl isobutyrate ,	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	tr	1400,26
23	52,10	Trans-caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,16	1417,86
24	53,28	Caryophyllene B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,04	1433,60
25	56,07	Neryl isobutyrate	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	0,05	1470,80
26	57,58	Bicyclogermacrene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,44	1490,94
27	59,91	(Z)-Nerolidol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,10	1522,57
28	61,86	Nerolidol trans-	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,21	1549,22
29	62,28	Germacrene B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,06	1554,96
30	64,55	Scapanol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,12	1586,00
31	65,41	Geranyl isopentanoate ,	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	0,11	1597,75
32	67,90	Unknown	-	0,27	1636,54
33	70,01	$\alpha$ -Bisabolol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,06	1669,70
34	71,85	Unknown	-	0,28	1698,61
35	73,07	Farnesol (isomer 2)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0,03	1717,87
36	74,53	Bisabolol oxide A	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	0,05	1740,93
Total de composés identifiés (%)				98.66	
Groupes de composés					
Monoterpenes hydrocarbonés				2.17	
Monoterpenes Oxygénés				95.4	
Sesquiterpenes hydrocarbonés				0.41	
Sesquiterpènes Oxygénés				0.68	

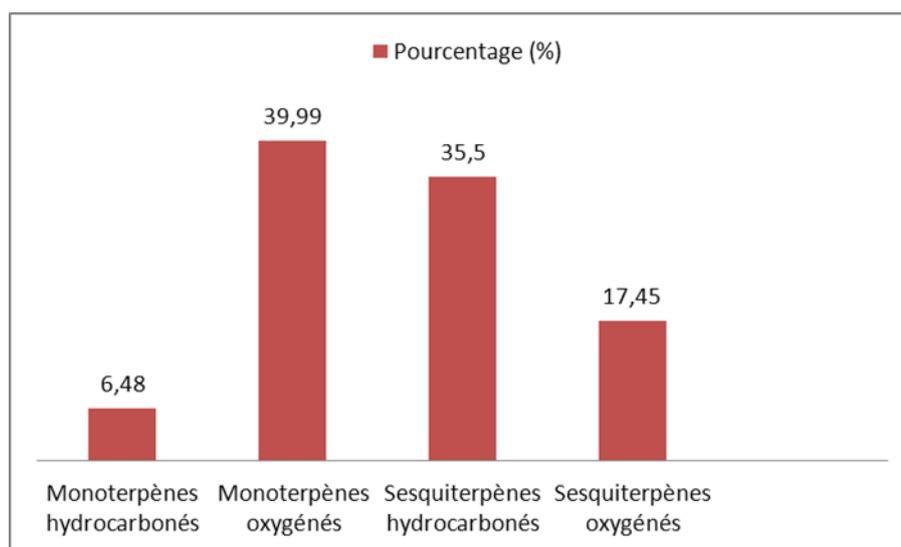
RT : Temps de rétention ; KI : Indices de kovats, Rtx-5MS (60mx0.25mm).



**Figure 33:** Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* (Del).

### III.5.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *Warionia saharae* (Bent & Coss).

L'analyse de l'huile essentielle de *Warionia saharae* par GC/MS, nous a permis d'identifier 37 composés représentant 99.84% de la composition globale de cette huile comme le montre le tableau 09. L'huile est dominée par la présence des monoterpènes oxygénés (39.99%) suivie par les sesquiterpène hydrocarbonés (35.5%), les sesquiterpènes oxygénés (17.45%) et les monoterpènes hydrocarbonés (6.48%) comme le montre l'histogramme sur la **Figure 34**.



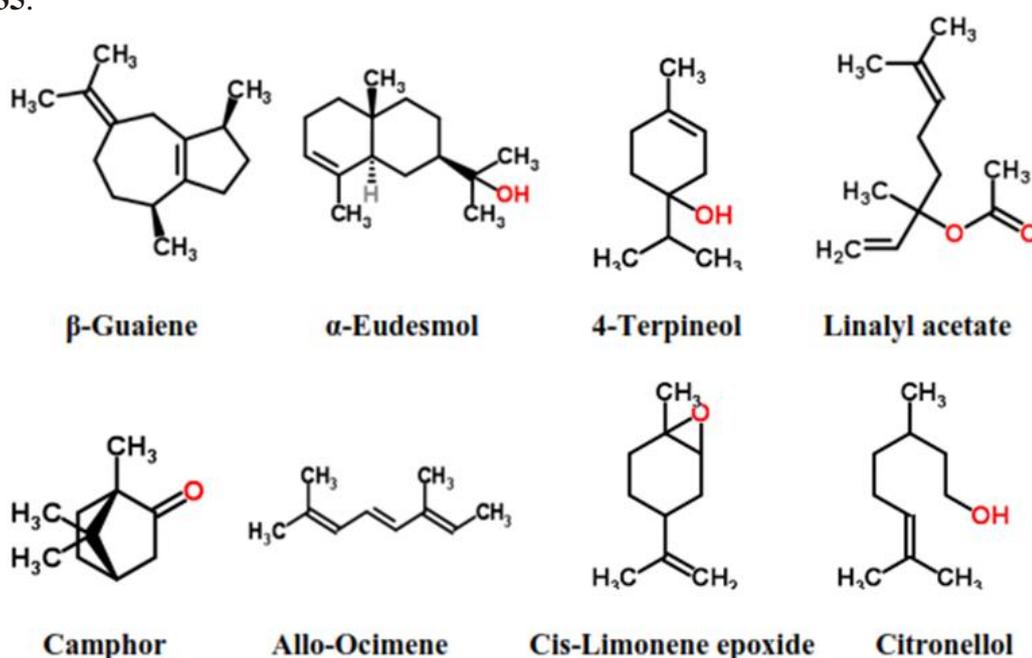
**Figure 34:** Histogramme représentant la teneur des différentes classes chimiques pour l'huile essentielle de *Warionia saharae* (Benth & Coss).

Les monoterpènes oxygénés sont repartie selon leurs groupes fonctionnelles en cinq groupes chimiques: Six alcools et phénols (Linalool, Borneol, **4-Terpineol**, **Citronellol**, Geraniol et Carvacrol) représentant 20.87% des constituants de l'huile, cinq esters (**Linalyl acetate**, **Lavandulyl acetate**,  $\alpha$ -Terpinyl acetate, Neryl acetate et Geranyl acetate) représentant 7.18%, deux éthers (**Limonene epoxide Cis-**, Bornyl isobutyrate) représentant 8.91% et trois cétones (Carvone oxide et  $\beta$ -Damascone et **Camphor**) représentant 0.62% et un autres composé aromatique le **Dillapiol** représentant 1.94% de la composition chimique de cette huile essentielles. Les monoterpènes hydrocarbonés sont représenté par :  $\alpha$ -Fenchene,  $\alpha$ -Phellandrene, Limonene, (E)- $\beta$ -Ocimene, (Z)- $\beta$ -Ocimene, Cis-Dihydromultifidene et Terpinolene. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont représenté par : B-Elemene, Trans-caryophyllene, Caryophyllene B, Bicyclogermacrene et Germacrene B. Les sesquiterpènes oxygénés sont repartie en deux groupes chimiques: cinq alcools ((Z)-Nerolidol, trans-Nerolidol, Scapanol,  $\alpha$ -Bisabolol, Farnesol (isomer 2) et le Bisabolol.

**Tableau 09:** Différents classes des composés majoritaires identifiés dans l'huile essentielle de *Warionia saharae* (Benth & Coss).

Classe de composés	Nom des composés identifiés	Pourcentage (%)
Monoterpènes Hydrocarbonés	Sabinene, B-Pinene, Myrcene, $\alpha$ -Phellandrene, P-Cymene Limonene, Ocimene et <b>Allo-Ocimene</b>	6.48
Monoterpènes Oxygénés Alcools et phénols	Linalool, Borneol, <b>4-Terpineol</b> , <b>Citronellol</b> , Geraniol et Carvacrol.	39.99 20.87
Ester	<b>Linalyl acetate</b> , <b>Lavandulyl acetate</b> , $\alpha$ -Terpinyl acetate, Neryl acetate et Geranyl acetate.	7.18
Ether	<b>Limonene epoxide Cis-</b> , Bornyl isobutyrate	8.91
Cétone	Carvone oxide et $\beta$ -Damascone et <b>Camphor</b>	0.62
Autre	<b>Dillapiol</b>	1.94
Sesquiterpènes Hydrocarbonés	Longicyclene, (E)-Caryophyllene, (E)- $\beta$ -Caryophyllene, <b>Caryophyllene B</b> , Tyjopsène, <b><math>\beta</math>-Guaïene</b> et $\gamma$ -Cadinene	35.5
Sesquiterpènes Oxygénés Alcools et phénols Acides	<b><math>\alpha</math>-Eudesmol</b> Nerolic acide	17.45 0.57

Les principaux composés majoritaires sont :  $\beta$ -Guaïene (32.89%),  $\beta$ -Eudesmol (17.45%), 4-Terpineol (15.69%), Allo-Ocimene (5.84%), linalyl acetate (5.38%), Camphor (5.14%), le Citronellol (4.09%) et le Cis-Limonene epoxide (3.54%) représentés dans la **Figure 35**.



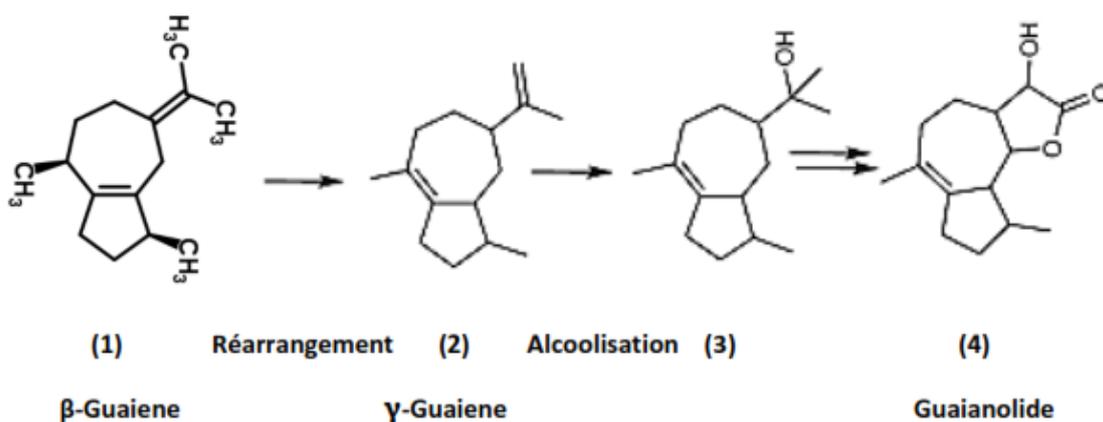
**Figure 35:** Composés majoritaires de l'huile de *Warionia saharae* (Bent & Coss)

La composition chimique de notre huile essentielle extraite de la partie aérienne de *Warionia saharae* collectée au sud-ouest de l'Algérie est différente de celle extraite des feuilles de la même espèce collectée en Algérie par **Mezhoud et al., (2014)** dont les composés majoritaires sont : **Linalool (27.7%)**,  **$\beta$ -Eudesmol (25.7%)**, (E)-Nerolidol (8.4%), Geraniol (7.1%),  $\alpha$ -Terpineol (5.5%) , Nerol (2.4%), Eremoligenol (2.1%), $\alpha$ -Agarofurane (1.7%) , 1,8-cineol (1.4%) and limonene (1.3%). Ou celle collectée par **Gherib et al., (2014)** dont les composés majoritaires sont :  **$\beta$ -Eudesmol (17.6–32.9%)**, (E)-Nerolidol (15.8–30.4%) et Linalool (15.3–32.1%). Carvotanacetone (0.7–9.3%), Geraniol (0.8–3.7%),  $\alpha$ -Terpineol (1.2–3.7%) et 1.8-cineole (0.8–2.6%). Ou même celle extraite des feuilles de la même plante collectée au sud-ouest algérien par **Yakoubi et al., (2015)** dont les composés majoritaires sont  **$\beta$ -Eudesmol (32.87%)**, isomenthol (6.27%), Terpinyl butyrate (5.51%), Trans-nerolidol (5.31%), Linalool (4.99%), Terpinen-4-ol (3.55%) and Caryophyllane a (3.36%).

Au Maroc plusieurs études ont entamé le sujet de la composition chimique de cette huile essentielle. **Essaqui et Benaissa., (2013)** ont révélé la présence de :  **$\beta$ -Eudesmol (29.83 %)**, (E,E)-Farnesyl acetate (12.66 %), Linalyl butyrate (5.16 %), Isoterpinolene (4.36 %) and Guaiol (4.22 %) composés majoritaires. **Znini et al., (2013)** ont signalé que l'huile est composée de :  **$\beta$ -Eudesmol (34.9%)**, Nerolidol-E (23%) et Linalool (15.2%) comme composés majoritaires. Et **Sellam et al., (2014)** ont porté que cette huile à le  **$\beta$ -Eudesmol (24.6%)**, trans-nerolidol (18.2%), Linalool (16.8%), 1,8 Cineole (6.2%), Camphor (4.6%), p-Cymene (3.7%) and Terpinen-4-ol (3.6%) comme composés majoritaires.

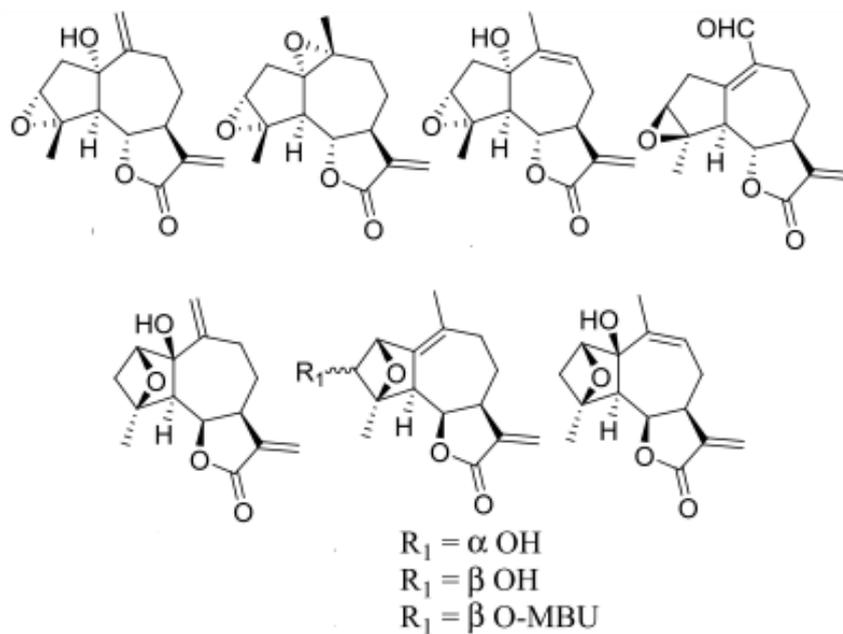
Suite à cette étude comparative on remarque que l'ensemble des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Warionia saharae*, sont varié et très différents d'une région à l'autre, même si le  **$\beta$ -Eudesmol** est le composé majoritaire principal dans la plus part des études entrepris sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Warionia saharae*. En revanche ce composé est en deuxième position avec un pourcentage de (17.45%) dans notre étude et avec un pourcentage de (25.7%) dans l'étude réalisé par **Mezhoud et al., (2014)**. La différence observer entre la composition chimique de l'huile de *Warionia saharae* de sud-ouest algérien (riche en Guaiene) et celles des autres origines (dominées par Linalool ou plutôt par le  $\beta$ -Eudesmol) pourrait s'expliquer par une adaptation de la plante aux facteurs abiotiques tels que, le climat spécifique de chaque région, aux facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol qui orientent la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis **Mansouri et al., (2011)**.

Le meilleur de notre étude est l'identification de  $\beta$ -Guaïene comme composé majoritaire de l'huile essentielle de *Warionia saharae* ce dernier qui a été signalé par son dérivé alcoolique Guaiol (4.22 %) parmi les composés majoritaires de l'huile essentielle de la même plante récolté au Maroc (Essaqui et Benaissa., 2013). D'autre part, Paul Drew et al., (2012) ont rapporté que le  $\beta$ -Guaïene est le précurseur de la biosynthèse des Guaianolides selon le mécanisme représenté dans la **Figure 36**.



**Figure 36:** La voie biosynthétique proposée du guaianolide lactones sesquiterpéniques proposé par Paul Drew et al., (2012).

Les Guaianolides lactones sesquiterpéniques (composés anti-inflammatoires), ont été identifiés pour la première fois dans les extraits méthanoliques des feuilles de la plante *Warionia* par Hilmi et al., (2002 et 2003). Selon Zidorn., (2008), ces composés contribuent également à la plus grande part de tous les Sesquiterpènes oxygénés trouvés jusqu'ici dans la plante *Warionia saharae* cette dernière qui est à ce jour le seul genre des Cichorieae de la famille des asteraceae qui a donné des epoxy-Guaian-12,5-olides comme le montre la **Figure 37**.



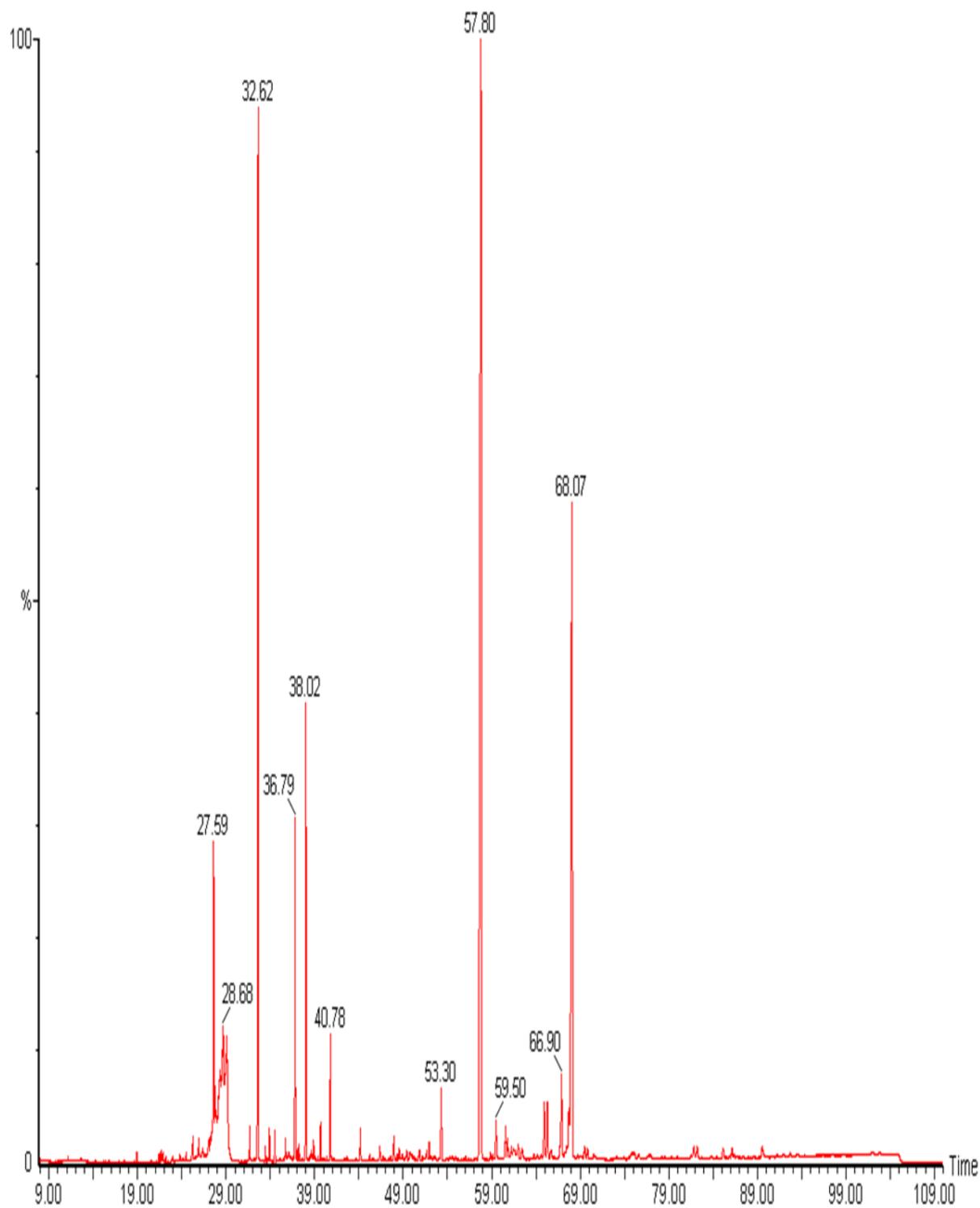
**Figure 37:** Structure des quelques epoxy-Guaian-12,5-olides dérivées de Guaiene extraite de la plante *Warionia saharae* selon **Zidorn., (2008)** et **Hilmi et al., (2003)**.

**Table 10:** Composition chimique de l'huile essentielle de *Warionia saharae* (Coss & Bent).

No	RT	Name of compounds	Formula	Area (%)	KI
01	15.19	Non Identifier	-	tr	970,60
02	15.38	Sabinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	tr	973,21
03	15.75	Non Identifier	-	0,01	978,29
04	16.00	B-Pinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	tr	981,72
05	16.22	Myrcene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	tr	984,75
06	16.53	α-Terpinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	tr	989,00
07	16.94	β-Myrcene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,52	994,64
08	17.54	α-Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0,02	1002,44
09	17.68	Non Identifier	-	-	1004,07
10	18.65	P-Cymene	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	0,10	1015,38
11	19.16	Non Identifier	-	-	1021,32
12	19.38	Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	tr	1023,88
13	21.64	Ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	1050,22
14	25.26	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,25	1092,41
15	27.59	<b>Limonene epoxide Cis-</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O</b>	<b>3,54</b>	1119,56
16	28.68	<b>Allo-Ocimene</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub></b>	<b>5,84</b>	1131,97
17	29.07	<b>Camphor</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O</b>	<b>5,14</b>	1136,48
18	31.67	Borneol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,40	1166,50
19	32.62	<b>4-Terpineol</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O</b>	<b>15,69</b>	1177,48
20	33.90	Salicylate de Methyl	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	0,37	1192,26
21	36.72	<b>Citronellol</b>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O</b>	<b>4,09</b>	1225,77
22	38.02	<b>Linalyl acetate</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>5,38</b>	1241,36
23	39.68	Geraniol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0,41	1261,27
24	40.78	<b>Lavandulyl acetate</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>1,43</b>	1274,46
25	42.62	Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	0,03	1296,52
26	43.71	Non Identifier	-	0,04	1310,19
27	44.17	Nerolic acide	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	0,47	1316,05
28	45.23	α-Terpinyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,08	1329,55
29	46.36	Neryl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,23	1343,94
30	47.58	Geranyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,06	1359,49
31	47.95	Carvone oxide	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,43	1364,20
32	48.56	Longicyclene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,17	1371,97
33	49.43	β-Damascone	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	0,19	1383,05
34	50.85	Bornyl isobutyrate	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	0,23	1401,20
35	51.95	(E)-Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,26	1415,86
36	52.24	(E)-β-Caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,04	1419,73
37	53.30	<b>Caryophyllene B</b>	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub></b>	<b>1,24</b>	1433,87
38	54.60	Tyjopsène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,11	1451,20
39	57.80	<b>β-Guaiene</b>	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub></b>	<b>32,89</b>	1493,87
40	59.50	γ-Cadinene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0,79	1516,96
41	66.90	<b>Dillapiol</b>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>1,94</b>	1620,83
42	68.07	<b>β-Eudesmol</b>	<b>C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O</b>	<b>17,45</b>	1639,22

Total des composés identifiés (%)	99.84
Grouped compounds	
Monoterpenes hydrocarbons	6.480
Oxygenated monoterpenes	39.99
Sesquiterpenes hydrocarbons,	35.50
Oxygenated sesquiterpenes,	17.45

, 26-Jun-2013 + 00:48:42



**Figure 38** : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Warionia saharae* (Coss & Bent).

### III.6. Activité antimicrobienne

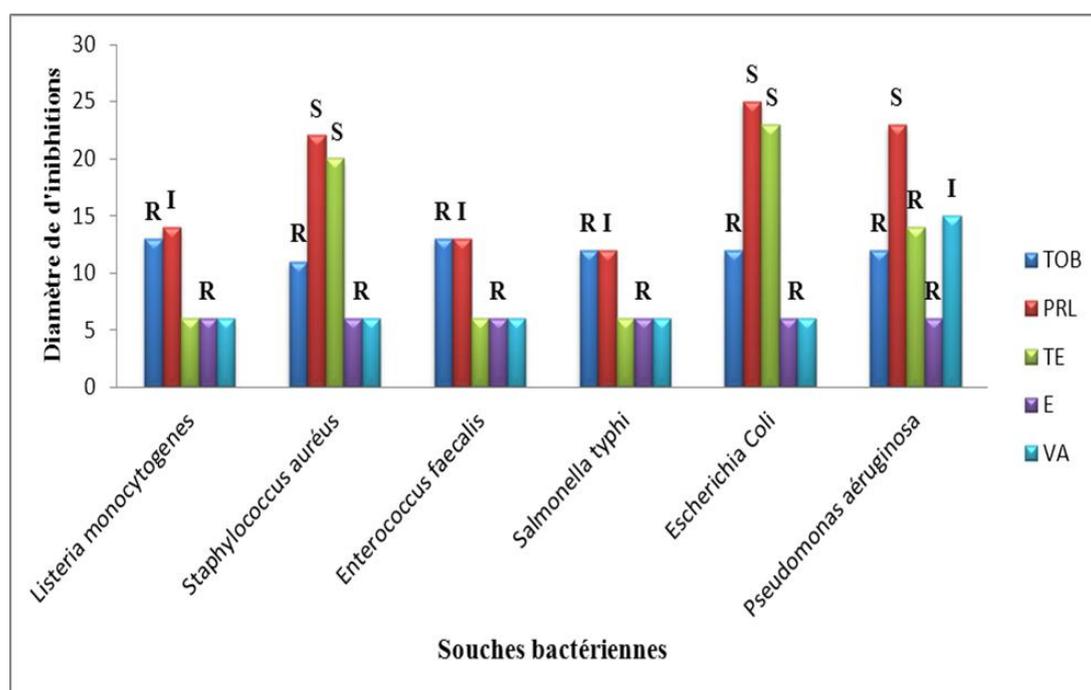
#### III.6.1. Résultats du test de résistances des souches bactériennes testés aux antibiotiques

Les résultats Comme le montre le **Tableau 11**, sont interprétés selon l'extrait des recommandations 2012, du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (S.F.M).

**Tableau 11:** Résultats du test de sensibilité des souches aux antibiotiques

Antibiotiques	TOB	PRL	TE	E	VA
Charge des disques (µg)	10	100	30	15	30
Sensible > (mm)	18	20	19	22	17
Résistante < (mm)	16	12	17	17	-
Souches bactériennes	Diamètres d'inhibitions				
<i>Listeria monocytogenes</i>	13	14	6	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	22	20	6	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	13	13	6	6	6
<i>Salmonella typhi</i>	6	12	6	6	6
<i>Escherichia Coli</i>	12	25	23	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	23	14	6	15

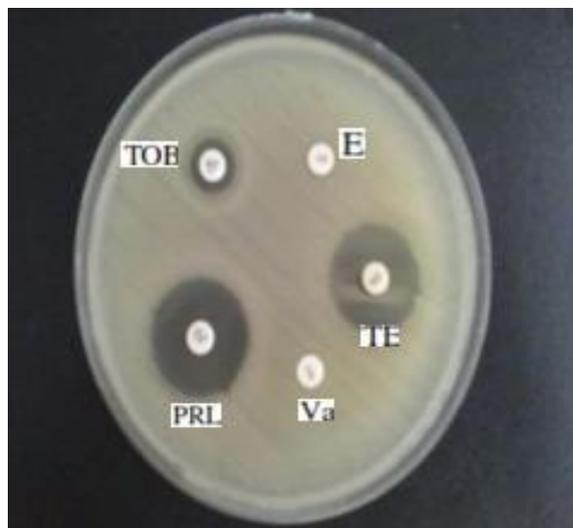
L'antibiogramme réalisé avec toutes les souches bactérienne testées vis-à-vis les cinq molécules d'antibiotiques appartenant à cinq familles différentes, montre que ces souches sont résistante a la plus part des antibiotiques testés comme le montre l'histogramme dans la **Figure 39**.



**Figure 39 :** Histogramme représentant les souches et leurs résistances aux antibiotiques testés.

- *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* sont résistante à tous les antibiotiques sauf à l'antibiotique PRL de la famille des Pénams ou elle présente une sensibilité intermédiaire.
- *Staphylococcus aureus* est présente une sensibilité au PRL, une sensibilité intermédiaire au tétracycline TE et une résistance aux antibiotiques : aminosides TOB, E (Macrolide) et Va (divers).
- *Salmonella typhi* est résistante à tous les antibiotiques.
- *Escherichia Coli* comme le montre la **Figure 40** et *Pseudomonas aëruginosa* sont résistantes à l'aminosides TOB, E (Macrolide) et Va (divers) et sensible à PRL (Pénams) en plus *Pseudomonas aëruginosa* est sensible à l'antibiotique TE (Tétracycline).

D'après ces résultats on constate que *Salmonella typhi* et *Pseudomonas aëruginosa* sont résistante à 70% et sensible à 20% des antibiotiques testés. Pour *Escherichia Coli* et *Staphylococcus aureus* sont résistante à 60% et sensible à 40% des antibiotiques testés de cela on peut conclure que nos souches ont un aspect résistant à la plupart des antibiotiques testés avec un pourcentage de 65%.



**Figure 40** : Antibiogramme d'*Escherichia Coli* (Antibiotiques : TOB, E, PRL, Va et TE).

### III.5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles des deux plantes étudiées

Les huiles essentielles des parties aériennes des deux plantes *Cotula cinerea* et *Warionia saharae* ont été étudiées et décrites dans la littérature par plusieurs groupes pour leurs propriétés biologiques intéressantes et pour leurs composés bioactives variés. Dans ce cadre notre étude consiste à la recherche de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des deux plantes *Cotula cinerea* et *Warionia saharae*.

L'étude de cette activité a été réalisée par la technique de diffusion sur disques qui est une technique quantitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions. Au cours de cette étude, nous avons utilisé la méthode de Vincent afin d'effectuer un aromatochrome pour déterminer la sensibilité de dix souches microbiennes trois d'entre elles sont des bactéries à Gram négatif, trois à Gram positif et quatre moisissures, vis-à-vis les huiles essentielles extraites de la partie aérienne de deux plantes *Cotula cinerea* et *Warionia saharae*. Des disques de papier imbibés avec 10 $\mu$ l d'huiles essentielles pur sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé, en surface, avec une suspension bactérienne.

Après l'incubation, les diamètres des zones d'inhibitions, des souches inoculées avec l'huile essentielle sont notées et exprimés en millimètres. L'activité antimicrobienne a été estimée comme suit : Forte, pour des diamètres de zone d'inhibition supérieurs à 13mm (Souche Sensible) ; Moyenne, pour des valeurs comprises entre 6 mm et 13mm (Souche Intermédiaire) ; Faible ou nulle lorsque les diamètres n'excèdent pas 6 mm (souche résistante) (Billerbeck, 2007). D'après Ponce et al., (2003), une souche a une sensibilité extrême lorsque la zone d'inhibition dépasse 20 mm avec de faibles volumes d'huile essentielle testée.

Les résultats obtenus dans le test de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles, par la méthode des disques nous révèlent une légère variation des diamètres des zones d'inhibition allant de 13.83 à 22.33 mm pour l'huile de *Cotula cineria* et de 7 à 11.5 mm pour l'huile essentielle de *Warionia saharae*, selon les souches testés. Les microorganismes étudiés n'ont pas présenté la même sensibilité vis-à-vis ces deux huiles essentielles comme le montre si dessous le **Tableau 12**.

**Tableau 12:** Activité antibactérienne des huiles essentielles de la partie aérienne des deux plantes *Cotula cinerea* (Del) et *Warionia saharae* (Benth & Coss).

types	Souches bactériennes	Diamètres d'inhibitions (mm) de 10µl d'huile essentielles	
		<i>Cotula cinerea</i> (Del)	<i>Warionia saharae</i> (Benth & Coss)
Gram (+)	<i>Listeria monocytogenes</i>	22.33	11.5
	<i>Staphylocoque aureus</i>	18.16	8
	<i>Enterococcus faecalis</i>	15.33	11.33
Gram (-)	<i>Salmonella typhi</i>	17.66	9
	<i>Escherichia Coli</i>	15.33	9.66
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13.83	8
Moisissures	<i>Aspergillus flavus</i>	11	56
	<i>Aspergillus ochratus</i>	18	43
	<i>Aspergillus niger</i>	12	61
	<i>Penicillium expansum</i>	19	39

Suite aux résultats obtenu, on peut clairement voir que l'huile essentielle de *Cotula cineria*, c'est avérée très active sur les souches bactériennes Gram positifs et gram négatifs par rapport aux résultats obtenu pour l'huile essentielle de *Warionia saharae*. Inversement aux résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux huiles des deux plantes l'huile essentielle de *Warionia saharae* s'est montrée très active et toutes les souches fongiques en présenté des sensibilités extrêmes.

### III.5.1. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* (Del)

Les résultats obtenus dans le test de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne de *Cotula cineria*, par la méthode des disques nous révèlent une légère variation des diamètres des zones d'inhibition allant de 11 à 22.33 mm selon les souches testés. Les microorganismes étudiés n'ont pas présenté la même sensibilité vis-à-vis cette huile essentielle. D'après le tableau 9, L'huile de la partie aérienne de la plante *Cotula cinerea* a exposé une forte activité contre l'ensemble des souches testées (*Listeria monocytogenes*, *Penicillium expansum*, *Staphylocoque aureus*, *Aspergillus ochratus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et

une moyenne activité contre les deux souches fongiques (*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*) comme le montre **Figure 41**.



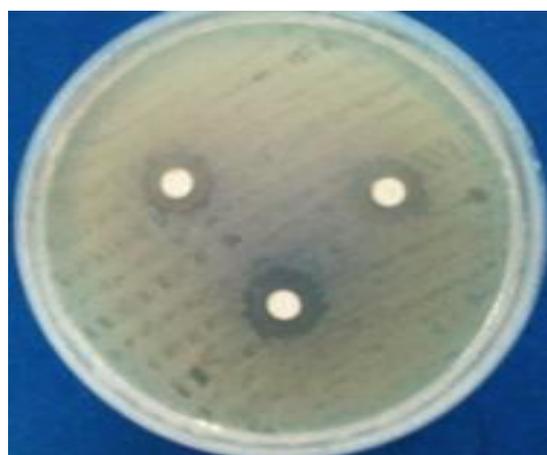
*Listeria monocytogenes* (Gram +)



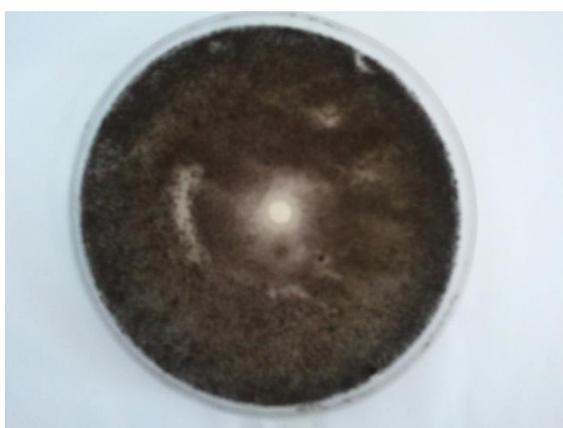
*Salmonella typhi* (Gram -)



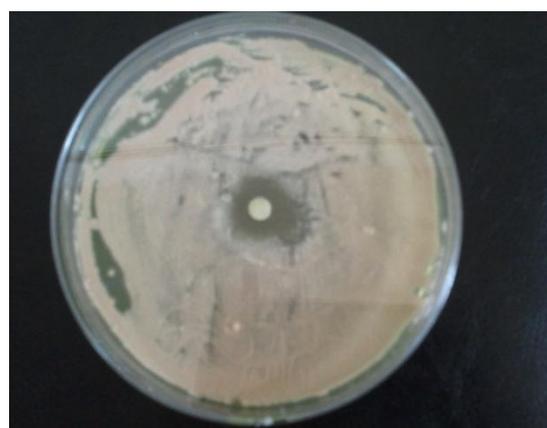
*Staphylococcus aureus* (Gram +)



*Escherichia Coli* (Gram -)



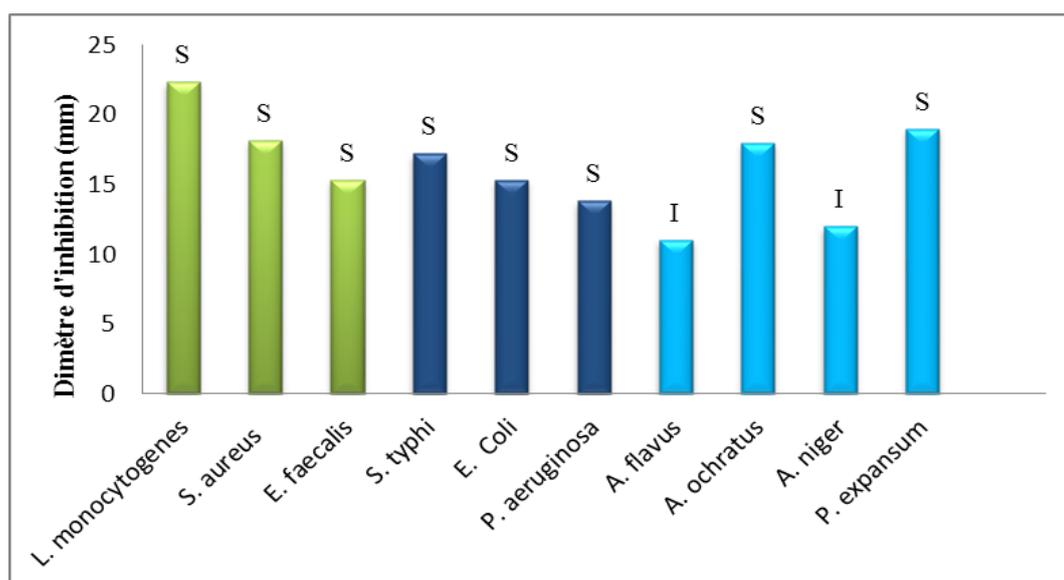
*Aspergillus niger*



*Pénicillium expansum*

**Figure 41:** Effet antibactérien de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* vis-à-vis quelques souches microbiennes testées

Au point de vue sensibilité microbienne, l'ensemble des souches testées étaient sensible à cette huile essentielle, l'extrême sensibilité est signalé pour *Listeria monocytogenes* (22, 33 > 20mm) suivie *Penicillium expansum* (13< 19 < 20mm), *Staphylocoque aureus* et *Aspergillus ochraceus* ont montré la même sensibilité (18.33 et 18mm respectivement), la plus faible sensibilité des bactéries est porté pour la souche multi-résistante *Pseudomonas aeruginosa*. Les souches les plus résistantes sont *Aspergillus flavus* (11mm) et *Aspergillus niger* (12mm) comme le montre l'histogramme dans la **Figure 42**.



**Figure 42:** Sensibilité des microorganismes testés à l'huile essentielle de la partie aérienne de *Cotula cinerea* (Del).

Avec des diamètres d'inhibition compris entre 15,33 mm et 22,33 mm, les bactéries Gram positives sont les plus sensibles à l'action de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* que les bactéries Gram négatives, à l'exception de *Salmonella typhi*. Parmi les bactéries Gram positives, les plus fortes inhibitions sont observées sur *Listeria monocytogenes* (22,33 mm) et sur *Staphylocoque aureus* (18,16 mm) et la plus faible est celle de *Enterococcus faecalis* (15,33mm).

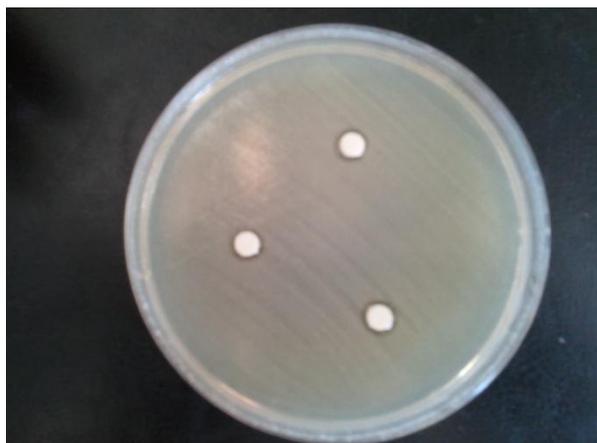
En générant un diamètre d'inhibition de 17,66 mm, l'huile de *Cotula cinerea* présente la plus forte activité contre *Salmonella typhi*, sur les autres bactéries Gram négatives, *Escherichia Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, ses effets sont plus modérés 15,33mm et 13,83mm respectivement. Ces résultats ne confirment pas les résultats obtenus par (Abdenebi et al., 2014) qui a montré que l'huile essentielle de cette espèce extraite dans la même région était inactive sur les souches gram positifs *Enterococcus faecalis* (6mm) et sur *Staphylocoque*

*aureus* (6 mm) et que cette huile été actifs sur les souches gram négatifs *Escherichia Coli* et *klebsiella pneumoniae* avec des zones d'inhibition 20mm et 20.7mm respectivement. Par ailleurs, nos résultats coïncident avec ceux de **El Abdouni K et al., (2016)** ayant étudié le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* récolté au Maroc sur presque les même souches bactériennes (*Listeria monocytogenes* , *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). En effet, dans ce travail, ils ont révélé une forte activité contre les Gram positif *Listeria monocytogenes* (19.05mm) et *Staphylocoque aureus* (19.05mm) et une activité modérée contre les Gram négatif *Escherichia Coli* (10.55mm) et *Pseudomonas aeruginosa*.

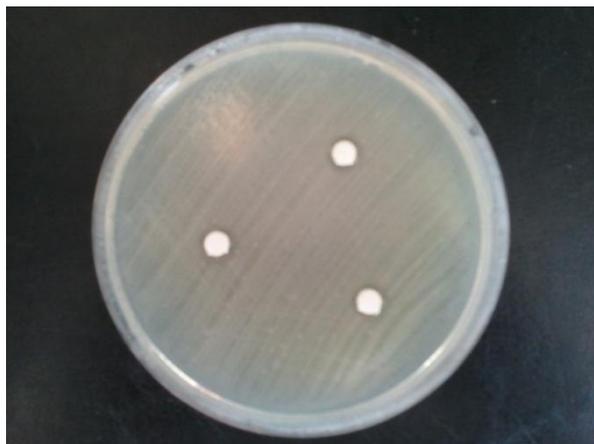
Pour les souches fongiques les diamètres d'inhibition sont compris entre 11mm et 19mm, l'huile de *Cotula cinerea* a exercé un effet inhibiteur intéressant sur les deux souches *Pénicillium expansum* et *Aspergillus ochraceus* en causant les diamètres d'inhibition 19mm et 18mm respectivement. Par contre cette huile essentielle a montré un faible effet inhibiteur sur les deux souches *Aspergillus flavus* (11mm) et *Aspergillus niger* (12mm).

### III.5.2. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Warionia saharae* (Benth & Coss)

D'après les résultats obtenus dans le test de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne de la plante *Warionia saharae* (Benth & Coss), par la méthode des disques, on remarque une large variation des diamètres des zones d'inhibition allant de 8 à 61 mm selon les souches testés. Là aussi les microorganismes étudiés n'ont pas présenté la même sensibilité vis-à-vis cette huile essentielle. L'huile de la partie aérienne de la plante *Warionia saharae*, a exposé une forte activité contre l'ensemble des souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* et *Pénicillium expansum*) et une moyenne activité contre l'ensemble des souches bactériennes (*Listeria monocytogenes*, *Staphylocoque aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia Coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) comme le montre la **Figure 43**.



*Listeria monocytogenes* (Gram +)



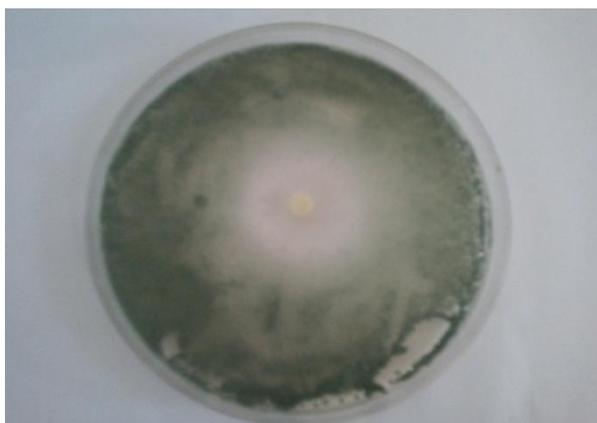
*Staphylococcus aureus* (Gram +)



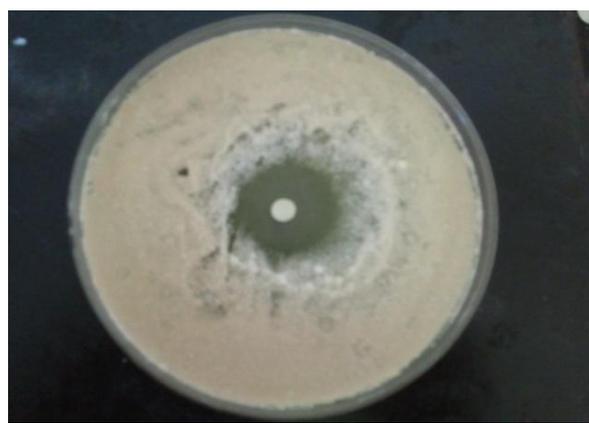
*Escherichia Coli* (Gram -)



*Salmonella typhi* (Gram -)



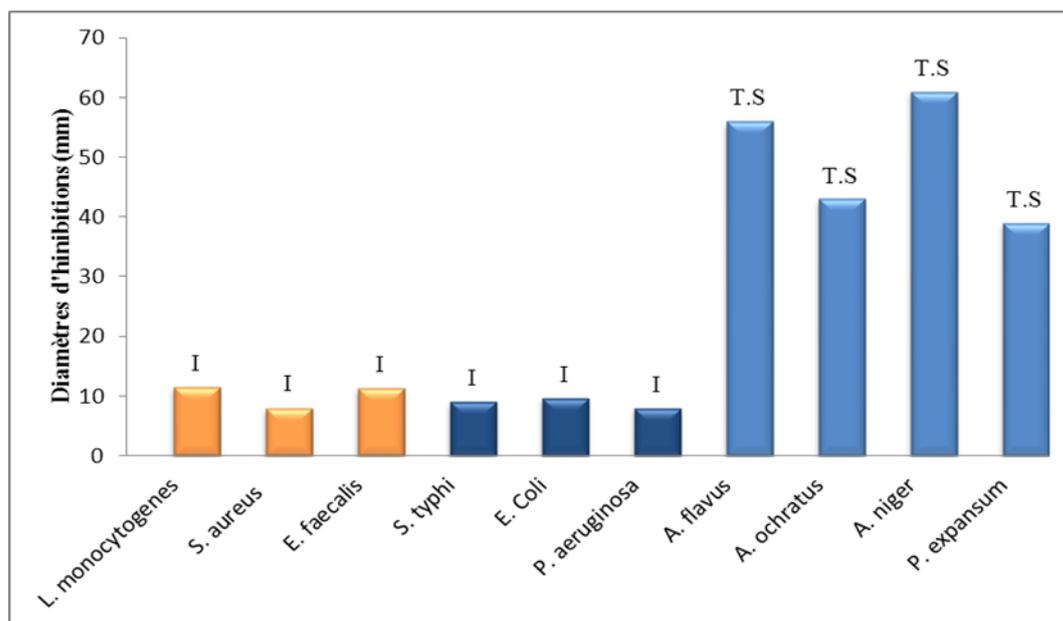
*Pénicillium expansum*



*Aspergillus ochraceus*

**Figure 43:** Effet antibactérien de l'huile essentielle de *Warionia saharae* vis-à-vis quelques souches microbiennes testées.

Au point de vue sensibilité microbienne, et avec des diamètres d'inhibition compris entre 39 mm et 61 mm, l'ensemble des souches fongiques testées étaient très sensibles à cette huile essentielle, l'extrême sensibilité est signalé pour *Aspergillus niger* (61mm) suivie par *Aspergillus flavus* (56mm), les souches *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium expansum* ont données (43 et 39mm) respectivement comme diamètre d'inhibition comme le montre l'histogramme sur la **Figure 44**.



**Figure 44** : Sensibilité des souches testées à l'huile de *Warionia saharae*.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Ghrib et al., (2014)** qui ont rapporté que l'huile essentielle de la partie aérienne de la plante *Warionia saharae* été peu ou pas active contre les bactéries testées *Pseudomonas aeruginosa* (10mm), *Escherichia Coli* (10mm), *Staphylocoque aureus* (13.2mm) et *Enterococcus faecalis* 11,2mm), en utilisant une charge de (15µl). En même temps les souches gram positifs avait été les plus sensibles que les souches gram négatifs.

### III.5.2. Détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu liquide

A cause de la sécheresse et la non disponibilité de l'huile essentielle de la plante *Warionia saharae* (*Benth and Coss*) et suite aux résultats après avoir réalisé la méthode de diffusion, toutes les souches bactériennes ont montrés une réponse positive au test de sensibilité à l'huile essentielle de la plante *Cotula cinerea* (*Del*), pour cela nous avons vu nécessaire de procéder à la détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) ainsi que la CMB (Concentration Minimale Bactéricide), par la méthode de dilution en milieu liquide ; la CMI, étant déterminée, à partir d'une gamme de concentrations allant de

1.55 à 198.5mg/ml d'huile essentielle, diluée dans un milieu de cultureensemencé comme le montre le **Tableau 13**.

Et afin d'évaluer l'activité de notre huile essentielle en terme bactéricides ou bactériostatique, le rapport CMB/CMI a été calculé. Si CMB/CMI = 1 à 2, l'effet est bactéricide et si CMB/CMI = 4 à 16, l'effet est bactériostatique (**Berche et al ., 1991 et El Amri et al., 2014**)

**Tableau 13** : Pouvoir antibactérien des huiles essentielles de la partie aérienne de la plante *Cotula cinerea*.

Concentration en huile essentielles de <i>Cotula cineria</i> (mg/ml)										
Souches microbiennes	Témoin	198.5	99.25	49.62	24.91	12.40	6.20	3.10	1.55	0.75
<b>Souches Bactériennes</b>										
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	-	-	-	-	-	-	±	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	-	-	-	-	-	-	±	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	++	-	-	-	-	-	-	±	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	++	-	-	-	-	-	-	±	+	+
<i>Escherichia Coli</i>	++	-	-	-	-	±	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	-	-	-	±	+	+	+	+	+
<b>Moisissures</b>										
<i>Aspergillus flavus</i>	++	-	-	-	±	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus ochraceus</i>	++	-	-	-	-	-	-	±	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	++	-	-	-	-	±	+	+	+	+
<i>Pénicillium expansum</i>	++	-	-	-	-	-	-	-	±	+
<b>Effets antibactérien de l'huile essentielle de <i>Cotula cinerea</i> (Del) selon le rapport CMB/CMI.</b>										
Souches bactériennes	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	Rapport CMB/CMI	Effets antimicrobiens						
<b>Souches Bactériennes</b>										
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.1	6.20	2	<b>Bactéricide</b>						
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1	6.20	2	<b>Bactéricide</b>						
<i>Enterococcus faecalis</i>	3.1	6.20	2	<b>Bactéricide</b>						
<i>Salmonella typhi</i>	3.1	6.20	2	<b>Bactéricide</b>						
<i>Escherichia Coli</i>	12.4	24.91	2	<b>Bactéricide</b>						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24.91	49.62	2	<b>Bactéricide</b>						
<b>Moisissures</b>										
<i>Aspergillus flavus</i>	24.91	49.62	2	<b>Fongicide</b>						
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3.1	6.20	2	<b>Fongicide</b>						
<i>Aspergillus niger</i>	12.40	24.91	2	<b>Fongicide</b>						
<i>Pénicillium expansum</i>	1.55	3.1	2	<b>Fongicide</b>						

L'huile essentielle de la partie aérienne de la plante *Cotula cinerea* s'est montrée très active et a inhibé tous les microorganismes testés à la concentration de 49.62mg/ml. Le germe le plus sensible était le champignon *Penicillium expansum* dont la croissance est inhibée à la 3.10 mg/ml. On note aussi que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi* et *Aspergillus ochraceus* ont été inhibés à la concentration de 6.20 mg/ml alors que *Pseudomonas aeruginosa* et *Aspergillus flavus* à la concentration 49.62 mg/ml. Nos résultats sont différents des résultats obtenus par **Abdenebi et al., (2015)** qui ont rapporté que les CMI pour *Aspergillus ochratus* et *Penicillium expansum* étaient 9.28mg/ml et 10.31 mg/ml respectivement. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Chouikh et al., (2015)** qui ont rapporté que les souches d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont montré une forte sensibilité à l'huile essentielle de cette plante avec une CMI égale à 1/8, et que la souche *Pseudomonas aeruginosa* était la souche la plus résistante. Nos résultats concordent aussi avec ceux de **El Bouzidi et al., (2012)** qui a démontré que l'huile essentielle de *Cotula cinerea* présente un large spectre d'activité antimicrobienne dans une étude réalisée sur quelques levures.

Cette activité antimicrobienne observée pour l'huile essentielle de cette espèce peut être attribuée au (E)-Citral et aux monoterpènes oxygénés qui représentent (95.40%) de la composition de l'huile. Cependant, l'action synergique des composants minoritaires ne peut être ignorée.

De l'analyse de la composition chimique et du pouvoir antimicrobien des deux huiles essentielles, il ressort que :

- nous pouvons déduire que l'huile essentielle de la plante *Cotula cinerea* (Del) avec sa composition chimique ((E)-citral (24.01%), Limonene epoxide cis- (18.26%), Thymol methyl ether (15.04%), Carvacrol (15.03%), Trans-carveol (13.79%)), possède une activité antibactérienne très importante par rapport à l'huile essentielle de la plante *Warionia saharae* (Benth & Coss). Cet effet bactéricide est probablement dû à l'effet de synergie entre les constituants chimiques des huiles essentielles présent en petite concentration (El Amri et al., 2014), ou bien à la domination de la composition chimique de huiles essentielle de *Cotula cinerea* par les monoterpènes oxygénés avec un pourcentage de 81.9% (El Bouzidi et al., 2011), cette classe qui est très riche en composés alcools ou phénoliques très actives sur les microorganismes. Selon Kalembe D et Kunicka A., (2003), divers composés chimiques ont une activité directe contre de nombreuses espèces de bactéries, tels que les terpènes et une variété d'hydrocarbures aliphatiques (alcools, aldéhydes et cétones). Par conséquent, un rang de l'activité a été proposée comme suit: phénols> aldéhydes> cétones> alcools> esters> hydrocarbures. Les aldéhydes sont connus pour avoir des activités antimicrobiennes puissantes Brands (1989-2005) et Plusieurs études ont démontré que le Citral est un des composés à forte action antibactérienne contre plusieurs micro-organismes pathogènes importants (Dorman et Deans 2000; Friedman et al., 2002, 2004; Wuryatmo et al. 2003; Sandri et al. 2007; Somolinos et al., 2008). Le citral causes un dommage subléta à l'enveloppe cellulaire (Gould 1989; Pagan et al. 1998; Garcia et al. 2005; Somolinos et al. 2008). Le carvacrol inhibe la croissance de plusieurs souches de bactéries, par exemple Escherichia coli (Wen-Xian DU et al., 2008). Chez Pseudomonas aeruginosa, il provoque des lésions de la membrane cellulaire de ces bactéries et, contrairement à d'autres terpènes, il inhibe la prolifération de ces germes (Cox S D et Markham., 2007). On attribue l'origine de ces propriétés antimicrobiennes à une désorganisation de la membrane bactérienne (Cristani et al., 2007).
- Inversement aux résultats obtenus de l'activité antibactérienne l'activité antifongique des deux huiles essentielles étudiées été très différente, l'huile essentielle de la plante *Warionia saharae* c'est avérer très active par rapport à l'huile essentielle de la plante *Cotula cinerea* qui a exercer lui aussi un effet fongicide très important. Cette forte

activité antifongique de l'huile essentielle de la plante *Warionia saharae* est probablement attribuée à sa composition chimique très riche en hydrocarbures monoterpéniques, et sesquiterpéniques révélés par l'analyse qualitative et quantitative de ces deux huiles essentielles. En effet, **Sokovic et Griensven (2006)**, en étudiant l'activité antifongique de l' $\alpha$ -pinène et du limonène, ont montré que la dose minimale utilisée pour inhiber totalement la croissance de quelques champignons variait de 4 à 9  $\mu\text{l/ml}$  seulement. Par ailleurs, **Chang et al., (2008)**. Ont montré que l'activité antifongique des sesquiterpènes est supérieure à celle des monoterpènes dans étude comparative de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Calocedrus macrolepis* et ces constituants tels que l' $\alpha$ -pinène, le limonène, le p-cymène et le Z-caryophyllène qui représentent, pour certains huiles essentielles des composés majeurs.

- En général l'ensemble des souches à Gram négatif sont moins sensibles aux huiles essentielles des deux plantes étudiées. Cependant, les souches à Gram positif sont les plus sensibles. Ce résultat est en accord avec plusieurs études précédentes (**Chao., 2000 et Smith-Palmer., 1998 in Barreto et al., 2008**) qui ont rapporté que les souches à Gram positif présentent souvent plus de sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles en général que les souches à Gram négatif, mais l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* reste un cas particulier avec une résistance accrue aux huiles essentielles. Cette résistance a été expliquée par l'effet barrière de la membrane externe de nature lipopolysaccharidique, qui empêche la diffusion de l'huile essentielle à l'intérieur de la cellule (**Longbottom et al., 2004 et Mann et al., 2000 in khadir et al., 2013**). Selon **Poole., (2001)** et **Busatta et al., (2008)**, la grande résistance des bactéries à Gram (-) aux huiles essentielles est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+). Par contre, **Celikel et Kavas., (2008)** ont souligné, que l'action des huiles essentielles volatiles a peu d'influence sur l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram (-) et Gram (+). Cependant, quelques huiles essentielles semblent être plus spécifiques, et exercent une importante activité inhibitrice contre les bactéries à Gram (+) plus importante que sur bactéries à Gram (-). Les mécanismes d'action des huiles essentielles et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés.
- La variabilité du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est due certainement à la sensibilité des microorganismes aux différents composés chimiques qui dépendent

de la nature de l'espèce végétale, des chémotypes et des conditions climatiques (Lawrence, 1993 in Benabderrahmane *et al.*, (2009).

- En outre, le spectre d'action du pouvoir antibactérien des huiles essentielles s'avère très étendu dans la mesure où il reflète en quelque sorte la diversité de leurs composés chimiques (Scora *et al.*, 1998 ; Sonboli *et al.*, 2005 ; Carson *et al.*, 2006). De plus, on ne peut écarter l'action synergétique ou antagoniste de certains composés monoterpéniques (Ultee *et al.*, 1998 ; Koutsoudaki *et al.*, 2005).
- La comparaison de l'activité inhibitrice des antibiotiques standards et celle des deux huiles essentielles: nous a permis de faire une comparaison intéressante entre l'activité inhibitrice de la croissance des germes par des antibiotiques standards et l'effet antimicrobien de nos huiles essentielles. Les résultats obtenus ont montré une efficacité très remarquable, puisque la plupart des souches sélectionnées pour cette étude présentent une résistance presque totale à tous les antibiotiques standards testés (Tableau 4). *Salmonella typhi* qui est résistante à tous les antibiotiques standards, s'est montrée sensible pour les deux huiles essentielles étudiées. Cette remarque s'applique également pour les autres souches bactériennes qui ne sont sensible que pour le PRL (Pénams) ou bien le TE (Tétracycline) alors qu'elles sont sensible deus huiles essentielles testées. Cette constatation est en faveur de l'hypothèse que nous avons proposé au préalable et selon laquelle les huiles essentielles peuvent être utilisées comme alternatif antibactérien pour les souches présentant un problème de résistance aux antibiotiques standards sans traitement thérapeutique.

# *Conclusion générale*

## **Conclusion générale**

Dans le présent travail, on a tenté de contribuer à la valorisation de deux plantes très utilisées en médecine traditionnelle de la région de sud-ouest algérien pour leurs vertus thérapeutiques en établissant une relation entre la composition chimique de leurs huiles essentielles et leurs activités biologiques.

L'étude ethnobotanique réalisé dans la région de Béchar et ces communes au sud-ouest de l'Algérie a montré que les deux plantes *Cotula cinerea* (Del) et *Warionia saharae* (Benth et Coss) sont très utilisé par la population local de la région d'étude en médecine traditionnelle. La plante *Cotula cinerea* (Del) est utilisée pour le traitement des maladies tels que : Coliques, Tous, Diarrhée, Migraines, Maux de tête et Désordres digestifs. La plante *Warionia saharae* (Benth et Coss) est utilisée pour le traitement des maladies tels que : Gastro-intestinales, Rhumatismes, l'Ictère, Froids et Rhume, Calmant, Arthrite Rhumatoïde et anti-inflammatoires.

Le criblage phytochimique réalisé sur les deux plantes en question, basée sur des tests spécifiques a permis de montrer que les deux plantes sont riche en métabolites secondaires, notamment les Stérols insaturés et Terpènes, Flavonoïdes, Alcaloïdes, tanins, Saponosides, Stéroïdes, Cardenolides. Tous ces composés sont doués d'un grand pouvoir thérapeutique.

L'extraction des huiles essentielles des deux plantes a donnée : Les rendements les plus élevés pour la plante *Cotula* (0.244 % pour la masse végétale sèche et 0.198% pour la masse végétale fraîche) et les rendements les plus faible sont ceux obtenu de la plante *Warionia* (0.2% pour la plante sèche et 0.162 pour la plante fraîche). Ce qui nous mène à constater que l'état de la matière végétale affecte grandement l'extraction et le rendement en huiles essentielles.

Les caractéristiques physicochimiques des deux huiles essentielles étudiées avoisinent dans l'ensemble les normes de commercialisation des huiles essentielles.

L'analyse détaillée par GC/MS de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne de la plante *Cotula cinerea* (Del) a conduit à l'identification de 33 composés représentant 98.66% de sa composition chimique totale. Celle de *Warionia saharae* (Benth & Coss) a mis en lumière 37 composés représentant 99.84% de l'essence.

La composition chimique de l'huile essentielle de *Cotula cinerea* (Del) est dominée par la présence des Monoterpènes oxygénés (95.40%) suivie par les Monoterpènes

hydrocarbonés (2.17%), les Sesquiterpènes oxygénés (0.68%) et les Sesquiterpène hydrocarbonés (0.41%). Les composés majoritaires sont : (E)-citral (24.01%), Limonene epoxide cis- (18.26%), Thymol methyl ether (15.04%), Carvacrol (15.03%), Trans-carveol (13.79%), Carvone (3.06%) et Trans-piperitol (2.54%).

La composition chimique de l'huile essentielle de *Warionia saharae* (Benth & Coss, elle est constituée de monoterpènes oxygénés (39.99%) suivie par les sesquiterpène hydrocarbonés (35.5%), les sesquiterpènes oxygénés (17.45%) et les monoterpènes hydrocarbonés (6.48%). Les principaux composés majoritaires sont :  $\beta$ -Guaiene (32.89%),  $\beta$ -Eudesmol (17.45%), 4-Terpineol (15.69%), Allo-Ocimene (5.84%), linalyl acetate (5.38%), Camphor (5.14%), le Citronellol (4.09%) et le Cis-Limonene epoxide (3.54%).

Nos résultats diffèrent notablement de ceux rapportés dans la littérature, ce qui nous a obligé à supposer une variation chimique chez ces deux espèces probablement due à des facteurs éco-physiologique, génétiques ou encore environnementaux et confirmer la notion de chimotypes.

L'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles évaluée par la méthode de diffusion et la méthode de dilution en milieu liquide, à montrer que l'huile essentielle de la plante *Cotula cinerea* possède un effet inhibiteur bactéricide et fongicide très important vis-à-vis l'ensemble des souches testées. Toutefois *Pseudomonas aeruginosa* s'est montré un peu plus résistante a cette huile essentielles.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Warionia saharae* évaluée par la méthode de diffusion, s'est montrée peu active vis-à-vis des souches bactériennes testées ceci est dû probablement à la nature de la composition chimique de l'huile. Cependant, la même huile a manifesté une activité antifongique très importante sur l'ensemble des souches fongiques testées *Aspergillus niger* (61mm) suivie par *Aspergillus flavus* (56mm), les souches *Aspergillus ochratus* et *Penicillium expansum* ont données (43 et 39mm).

Ces résultats trouvés dans cette étude sont très intéressants puisqu'ils démontrent que les huiles essentielles de *Cotula cineria* et de *Warionia saharae* qui possèdent un pouvoir bactéricide et fongicide ont un large spectre d'action contre la plupart des souches microbiennes étudiées. Ce qui mit en évidence un potentiel important pour les huiles essentielles des deux plantes étudiées, particulièrement dans la conservation des denrées alimentaires et dans la formulation de nouveaux produits pharmaceutiques. Et servir dans la

prévention et le traitement de certaines maladies infectieuses, et combattre les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques usuels.

Enfin ce travail de valorisation a permis de mieux connaître deux plantes médicinales du Sud-Ouest Algérien : *Cotula cinerea* (Del) et *Warionia saharae* (Benth & Coss), et qui ne couvre cependant qu'une maigre partie de la gamme des espèces non encore étudiées jusqu'ici du point de vue phytochimique et biologique, pourrait constituer une base de recherche pour la mise au point d'une nouvelle génération d'agents antimicrobiens naturels pouvant être utilisés chez l'Homme contre les infections rebelles aux antibiotiques et antifongiques classiques, à fin d'assurer le passage de la médecine traditionnelle à la médecine moderne avec une plus grande efficacité et une diminution de la toxicité de ces composés.

# *Références Bibliographiques*

A

- **Avorn** JL., Barrett JF., Davey PG., et al. Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics (ed). World Health Organization, Boston, MA, United States of America. 2001. pp1.
- **Atailia** I., Djahoudi A. Chemical composition and antibacterial activity of geranium essential oil (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivated in Algeria. *Phytothérapie* ; 2015 13 (3) : pp 156-162.
- **Amarti** F, El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Farah A, Khia A, Guedira A, Rahouti M and Chaouch A. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc. *Phytothérapie* 2011, 9(3) : pp 149-157.
- **Alexander** Pauli. *The International Journal of Aromatherapy* 13 (2–3): pp 143–146.
- **Abdenebi** A, Abdelwahed DJ E, Touati B, Bouaza M. Screening phytochimique et activité antibactérienne de huile essentielle de *Cotula cinerea* (gartoufa) dans la région de Béchar. *International Journal of Research in Engineering & Technology* 2014; 2 (2): pp 49-54.

B

- **Bahorun** T. (1997). Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit. Mauritius :disponible sur : [http://www.researchgate.net/publication/252872937 SUBSTANCES NATURELLES ACTIVES LA FLORE MAURICIENNE UNE SOURCE D'APPROVISIONNEMENT POTENTIELLE](http://www.researchgate.net/publication/252872937_SUBSTANCES_NATURELLES_ACTIVES_LA_FLORE_MAURICIENNE_UNE_SOURCE_D'APPROVISIONNEMENT_POTENTIELLE) , mis à jour 2014, visité le 18/5/2014.
- **Benamara-Bellagha** Meriem. Organisation du génome et étude palynologique de quelques espèces algériennes du genre *Centaurea* L. Thèse de doctorat université de Constantine 2015.
- **Burgot** G., Burgot J. L., Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications :Méthodes chromatographiques électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques, 3<sup>ème</sup> Edition Tec & Doc Lavoisier, **2011**, pp 10.
- **Boutaghane** N. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae). Thèse de doctorat université de Constantine 1; 2013.

- **Bachelot** C, Blaise A, Corbel T, Le Guernic A . Les huiles essentielles, Extraction et Comparaison. Licence 2 Biologie. Semestre 2, U.C.O. Bretagne Nord 2005/2006. Disponible sur : [www.ladissertation.com/Sciences-et-Technologies/Sciences-Cognitives/Tachnique-D'analyse-48330.html](http://www.ladissertation.com/Sciences-et-Technologies/Sciences-Cognitives/Tachnique-D'analyse-48330.html)
- **Bruneton** J. (1999). pharmacognosie phytochimie plantes médicinales .2<sup>ème</sup> édition. Ed tec et doc.
- **Bruneton** Jean. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> Edition Lavoisier 2009. pp 574.
- **Bouchdjira** Ahmed. (2000), “écotourisme dans la zones désertiques en Algérie”. disponible sur : [www.bochdjira-fr.html](http://www.bochdjira-fr.html).
- **Buchbauer** G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Journal of Flavour and Fragrance, 2011; 27 (1) : pp 13-39.
- **Ben Marzoug** H.N., Romdhane M., Lebrihi A., Mathieu F., Couderc F., Abderraba M., Khouja M.L et Bouajila J. Eucalyptus oleosa Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). Molecules 2011; 16 (2): pp 1695-1709.
- **Berche** P., Gaillard J.L et Simonet M. Les bactéries des infections humaines. Éditeur : Flammarion, Médecine & Sciences 2011 : pp 660.
- **Berche** P. Bactériologie Systématique. Faculté de Médecine Necker-Enfants malades, Paris V, 2002/2003 : pp 1-94.
- **Belhattab** R., Larous L., Kalantzakis G., Boskou, D. et Exarchou V. Antifungal Properties of *Origanum Glandulosum* Desf. Extracts. Food Agriculture & Environment 2004 ; 2 (1): pp 69-73.
- **Billerbeck** de V.-G. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Pharmacognosie Phytothérapie 2007; 5 (5): pp 249–253.
- **Burt** S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 2004; 94 (3): pp223-253.
- **Brands** S. J. (1989-2005). Systema Naturae 2000. Amsterdam: The Netherlands.
- **Bouziane** M. Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la

plante : *Cotula cinerea* de la région de Ouargla. Mémoire de magister Université de Ouargla Algérie 2002.

- **Bauer**, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single method. *American Journal of Clinical Pathology* 1996 ; 45 : 493-496.

#### C

- **Cavalli** Jean- François. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone 13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat, Université de Corse, France, 2002.
- **Caillet** S, Lacroix M (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA Université de Laval, Québec, Canada, 1-8.
- **Covarrubias** C M., Bongard S., Champion D. et Voilley A. effects of the nature and concentration of substrates in aqueous solutions on the solubility of aroma compounds. *Journal of Flavour and fragrance journal* 2005; 20 (3): 265–273.
- **Chibani** salih. Etude phytochimique et biologique de six plantes de l'est Algérien. Thèse de doctorat université de Constantine 1 ; 2013.
- **Chouikh** A, Mayache B, Maazi M C, Hadeif Y, Chefrou A. Chemical Composition and Antimicrobial activity of Essential Oils In Xerophytic Plant *Cotula cinerea* Del (Asteraceae) during two stages of development: flowering and fruiting. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2015; 5(3): 029-034.
- Chang H, Cheng Y, Wu S, et al. (2008) Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technol* 99: 6266–70

#### D

- **Durmaz** H., Sagun E., Tarakci Z., et Ozgokce F. Antibacterial Activities of *Allium Vineale*, *Chaerophyllum Macropodium* and *Prangos Ferulacea*. *African Journal of Biotechnology*, 2006 ; 5 (19): pp1795-1798.
- **Djellouli** M (2008). Composition chimique des huiles essentielles et quantification des flavonoïdes de trois plantes de sud-ouest algérien. Mémoire de magister. Université de Béchar.
- **Djellouli** M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L, Hamidi N, Badraoui M, et al. Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae

family) from the region of south west Algeria. Asian Journal of natural and applied sciences 2013; 2 (2): 59-65.

- **Djellouli** M, Benmehdi H., Mammeri S., Moussaoui A., Ziane L et Hamidi N. Chemical constituents in the essential oil of the endemic plant *Cotula cinerea* (Del.) from the southwest of Algeria. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5(10): pp 930-932.

E

- **Elhaib** A. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de doctorat. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2011.
- **Eddouks** M., Ouahidi M.L., Farid O., Moufid A., khalidi A., Lemrachi A. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* (2007) ; 5 (4) : pp 194-203.
- **El Kalamouni** Chaker. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de doctorat université de Toulouse, France 2010.
- **El Akhal** F, El Ouali Lalami A, Ez Zoubi Y, Greche H, Guemmouh R. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Asian Pac J Trop Biomed 2014; 4(9): pp 746-750.
- **El Bouzidi** L., Abbad A., Fattarsi K., Hassani L., Leach D., Markouk M., et al. Chemical composition and anticandidal properties of the essential oil isolated from aerial parts of *Cotula cinerea*: a rare and threatened medicinal plant in Morocco. *Nat Prod Commun* 2011; 6 (10): pp 1491-1494.
- **El Amri** J, Elbadaoui K, Zair T, Bouharb H, Chakir S, Alaoui T. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *J. Appl. Biosci* 2014 ; 82:7481– 7492.
- **Essaqui** A. et Benaissa M. Chemical Composition of the Essential Oils of Flowers of *Warionia saharae* from Morocco, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2013; 16 (3): pp 372-376.

F

- **Farnsworth** N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ* 1985; 63 (6): pp 965-81.
- **Fabricant** D.S., Farnsworth N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect* 2001; 109 (Suppl 1): pp 69-75.

#### G

- **Gausson** H., Deuroy, J.F. and Ozenda P. Précis de botanique II « les végétaux supérieurs ». Ed : Masson ,1982 ; pp 215-408.
- **Ghasemi Pirbalouti** A., Ghahfarokhi B.B., Ghahfarokhi S.A.M., Malekpoor F. chemical composition of essential oil from the aerial part and underground part of Iranian valerian collected from different natural habitats. *Industrial Crops and Products* 2015; 63 (6): pp 147-151.
- **Glenn** H. Stewart. Oil bodies of the New Zealand leafy Hepaticae (Jungermanniales). *New Zealand Journal of botany*, 1978; 16 (2): pp185-205.
- **Guinoiseau** E .Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat université de Corse- Pascale Paoli 2010 : pp 64-66.
- **Grysole** J (2003). Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique. 162 Corporation LASEVE. Disponible sur le site : [www.expansionstrategies.ca](http://www.expansionstrategies.ca), mise à jour le 28/03/2014.
- **Güllüce** M, Sökmen M, Daferera D, Agar G, Özkan H, Kartal N, Polissiou M, Sökmen A et Sahin F. In-vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2003; 51(14): 3958-3965.

#### H

- **Herzi** Nadjia. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat Université de Toulouse, France 2013.
- **Heywood**, V.H., Harborne J.B. and Turner B.L. The Biology and Chemistry of the Compositae Vol.1. Academic Press, London & New York 1977.
- **Hart** T., Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences, Flammarion. PARIS 1999 : pp 1-317.

- **Hada** T, Shiraishi A, Furuse S, Inoue Y, Hamashima H, Masuda K, Shiojima K, Shimada J (2003): Inhibitory effects of terpene on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Nature Medicine*, 57: 464-467.

I

- **Iserin**, P. Encyclopédie des plantes médicinales. Edition VUEF 2001: pp 8-50.
- **Irving** W., Ala'Aldeen D et Boswell T. *Medical Microbiology. Collection Instant Notes*. Taylor et Francis 2005 : pp 350.

J

- **Jasper** C. The *in vitro* antifungal activity of essential oils. *Journal of pharmaceutical science* 1958; 47 (4)

K

- **Kheyar** N, Meridja D, Belhamel K, Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, *Algerian J. Nat. Products*, 2014 ; 2(1) :1826.
- **Kansole** M.M.R, 2009, Etude Ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkinafaso : cas de leucas *Martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies, Université d'Ouagadougou, Burkinafaso.
- **Kambouche** N. Extraction, Composition chimique de l'huile essentielle d'Ajowan "Noukha" de la région d'Oran. Mise en évidence de son activité biologique. Mémoire de Magister, Université d'Oran Es-Sénia, 2000.
- **Kováts** E., Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System, in *Advances in Chromatography*, Chap. 7, 1965, 229- 247.
- **Khadir** A, Bendahou M, Benbelaid F, Abdoune M.A., Abdelouahid D.E. Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie. *Phytothérapie* 2013; 11(6):353-358.
- **Kayser** F.H., Bienz K.A., Eckert J. et Zinkernagel R.M.,. *Medical Microbiology*. Edition Thieme Medical Publishers Inc 2004: P 698.
- Kalembe D, Kunicka A (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
- **Kalembe** D et Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 2003; 10: 813-829.

- **Kabelitz** N, Santos PM et Heipieper HJ. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003; 220: 223-227.

L

- **Luicita** L R., Etude de l'extraction de métabolites secondaire de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, France 2006.
- **Lefkir** A., Elaboration de cartes thématiques sur les ressources hydriques dans une zone saharienne : cas de la wilaya de Béchar'', le deuxième séminaire nationale sur l'eau et l'environnement, Béchar le 12 et le 13 novembre 2005.
- **Lucchesi** M.E. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat université de la Réunion 2005.

M

- Maizak K, R. A. Brac de la perriere, V. Hammiche., 'Pharmacopée traditionnelle : Sahara septentrional', actes du 2<sup>ème</sup> colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg, 1993, 169-181.
- **Murwanashyaka** J.N. Mémoire de Maîtrise en Ressources Renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi 1995.
- **Pibiri** M.C. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole Polytechnique de Lausanne.2006.
- **Messai** L. Etude phytochimique d'une plante medicinale de l'est algérien (*Artemisia herba alba*). Thèse de doctorat université Mentouri Constantine 2011.
- **Markouk** M, Redwane A, Lazrek B H, Jana M, Benjama A. Antibacterial activity of *Cotula cinerea* extracts. *Fitoterapia*, 1999; 70: 314-316.
- **Malecky** M. Métabolisme des terpénoides chez les caprins. Thèse de doctorat. Life Sciences. Agro Paris Tech, 2008.
- **Muanda** F.N., Soulimani R, Diop B et Dicko A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Journal of Food Science and technology* 2011; 44: p 1865-1872.

P

- **Ponce** A.G., Fritz R., del Valle C., Roura S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT. Food Sci Technol* 36: 679–84.

R

- **Reverchon** E, De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural Matter. *The Journal of Supercritical Fluids* 2006; 38, 146–166.
- **Richard** A Holley et Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 2005; 22 (4): pp 273-292.
- **Rios**, J.L., Recio, M.C., et Villar, A. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review for the Literature. *Journal of Ethnopharmacology* 1988 ; 23(2-3): pp 127-149.

S

- **Svoboda**. K.P. Investigation of volatile oil gland of *satureja hortensis* L. (*Summer savory*) and phytochemical comparison of different varieties. *Int. Jour. Arom*, 2003 13 (4), pp 196-202.
- **Svoboda** K.P. et Hampson J.B. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW 1999.
- **Strehle** M. A, Rosch. P et Baranska. M. On the way to a quality control of the essential oil of fennel by means of Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 2005; 77(1): pp 44–52
- **Saïd** Rahal. *Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants*. Ed Office des Publications Universitaires. 2004.
- **Shin** S, Lim S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of Appl Microbiol* 2004; 97: pp 1289–96.
- **Shigenhara**.I, Shigéru.A, Hindego.Y et Matsumi.A. Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *The International Journal of Aromatherapy* 2004; 14(1): pp 33-41.
- **Saad** A. Caractérisation chimique des Huiles essentielles de trois plantes médicinales endémiques du sud - ouest Algérien : *Bubonium graveolens*, *Launaea arborescens* et *Limoniastrum feei*. Mémoire de Magister. Centre Universitaire de Bechar. 2006.

- **Sedik** M. Analyse physico-chimique et spectroscopique de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* de la région d'Adrar. Mémoire de magister université d'Oran 2010.
- **Sellam** K, Ramchoun M, Khalouki F, Alem C, El-Rhaffari . Biological investigations of antioxidant, antimicrobial properties and chemical composition of essential oil from *Warionia saharae*. *Oxid Antioxid Med Sci*. 2014; 3(1): 73-78.
- Sokovic M, Griensven LD (2006) Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus* Eur. J Plant Pathol 116: 211–24

T

- **Thomas** D.S., et Sunsun Y. *annu. Rev. plant. physiol. Plant mol. Boil.* 52 : pp 407-436.

V

- **Valnet** J. Aromathérapie – traitement des maladies par essences de plantes. 11<sup>ème</sup> Edition. Maloni. 1990.

W

- **Weerachai** P.T., Aworn D., Korth J., Pyne S., Picho P., NgamKhan J. et Buddhasukh D. The components and anticancer activity of the volatile oil from *Streblus asper*. *Flavour and Fragrance Journal* 2004 ; 19 : pp 445-447.

Y

- **Yakoubi** M., Belboukhari N., Cheriti A et Bouchkara M. Isolated and identified a chemical composition of the leaves extract of *Warionia saharae* from Algerian western south. Fifth International Scientific Agricultural Symposium,, Agrosym 2014''.

Z

- **Znini** M., Cristofari G., Majidi L., El Harrek A, Paolini J et Costa J. In vitro antifungal activity and chemical composition of *Warionia saharae* essential oil against 3 apple phytopathogenic fungi. *Food Sci Biotechnol* 2013; 22: pp 113-9.

# *Publications Internationales*



Contents lists available at ScienceDirect

## Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb



Original article doi:

©2015 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rights reserved.

Chemical constituents in the essential oil of the endemic plant *Cotula cinerea* (Del.) from the southwest of AlgeriaMohammed Djellouli<sup>1\*</sup>, Houcine Benmehdi<sup>2</sup>, Siham Mammeri<sup>1</sup>, Abdellah Moussaoui<sup>1</sup>, Laid Ziane<sup>2</sup>, Noureddine Hamidi<sup>2</sup><sup>1</sup>Laboratory of Valorization of Vegetal Resource and Food Security in Semiarid Areas, South West of Algeria, University of Béchar, Béchar, Algeria<sup>2</sup>Laboratory of Chemistry, Department of Chemistry, University of Béchar, Béchar, Algeria

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 May 2015

Received in revised form 18 May,

2nd revised form 5 Jun 2015

Accepted 19 Jun 2015

Available online 3 Jul 2015

## Keywords:

Essential oil

Gas chromatography-mass spectrometry analysis

*Cotula cinerea*

Asteraceae

Sahara plants

## ABSTRACT

**Objective:** To extract and identify the main constituents of the essential oil of *Cotula cinerea* (Del.) (Asteraceae family) from southwest of Algeria.**Methods:** The essential oils obtained by hydrodistillation, from the aerial parts of the endemic plant *Cotula cinerea* which was collected in the region of Sahara from southwest of Algeria, were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry.**Results:** A total of 33 compounds were identified representing 98.66% of the oil. The main compounds were (E)-citral (24.01%), limonene epoxide cis- (18.26%), thymol methyl ether (15.04%), carvacrol (15.03%), trans-carveol (13.79%), carvone (3.06%) and trans-piperitol (2.54%).**Conclusions:** The main constituents in essential oil of the aerial part of the plant from southwest of Algeria were different from that collected from southeast of Algeria or in Morocco.

## 1. Introduction

Because of their therapeutic properties, medicinal plants used in traditional medicine are one of the most interesting fields for the discovery of new drugs for the treatment of discharged diseases[1,2].

No one can deny or retract that the beneficial effects of Saharan plants guide us to explore the essential oils secreted from endemic plants that were found in the Béchar region (southwest of Algeria). *Cotula cinerea* (Del.) (*C. cinerea*) from Asteraceae (Compositae) family[3], is one of these endemic species and also the object of our study (Figure 1).

The genus *Cotula* comprising 80 species is widespread in the southern hemisphere and is represented by three species in Algeria among which is our plant *C. cinerea*[4].

The species *C. cinerea*, with synonym of *Brochia cinerea*[5], is a small woolly whitish plant, with thick leaf divided in their upper part to a 3-5 obtuse teeth, stems are 10-40 cm, slept then raised; capitulum from 6 to 10 mm in diameter, woolly involucre with a tubular flower, and brown buds which would become golden yellow[2-6].

The phytochemical screening of *C. cinerea* revealed the presence of flavonoids, tannins, alkaloids, saponins, terpenoids, steroids,

and cardenolides[2]. These compounds are known to exhibit a wide range of biological effects including antibacterial and antioxidant activities. These data could justify the traditional use of this plant[7].

This plant is usually known as “Guertofa” among the local people in Northern Sahara and is commonly used in traditional medicine in the southwest of Algeria, for the treatment of several diseases like colic, cough, diarrhea, headache, and digestive disorders. All parts of the plant are used in different forms (maceration, decoction, infusion or inhalation), according to the treated diseases[2].

The aim of this work is to extract and identify the main constituents of the essential oil obtained from the aerial part (leaves and stem) of *C. cinerea*, collected in the Southwestern Algeria.



Figure 1. Photograph of *C. cinerea* taken at the time of collection.

\*Corresponding author: Mohammed Djellouli, Laboratory of Valorization of vegetal Resource and Food Security in Semiarid Areas, South West of Algeria, University of Béchar, Algeria.

E-mail: amine\_841@hotmail.com

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant materials

The aerial parts (leaves and stems) of *C. cinerea*, were collected in February and March, 2011, in the mountains and desert of Lahmar City (30 km far away from Béchar State), in southwest of Algeria and southeast of Morocco. The plants were identified and a voucher specimen was deposited at the herbarium of the Valorization of Resource and Food Security in Semiarid Areas Laboratory, South West of Algeria, University of Béchar.

### 2.2. Extraction of essential oil

The aerial parts (1 kg) were washed, sorted and dried for one month at room temperature in the shade and then were finely pulverized by using a mill blade. Clevenger-type apparatus was used for extraction, and hydrodistillation was performed for 6 h. The essential oil was dried with magnesium sulfate, then weighed and stored under refrigeration at 4-6 °C in dark glass tubes for further use.

### 2.3. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Essential oils were analyzed by GC-MS (a Perkin Elmer Clarus 600 GC-MS system coupled with a Perkin Elmer Clarus 600C MS). Helium (1 mL/min) was used as a carrier gas. The initial temperature was 60 °C (2 min), then was increased to 200 °C at rate of 5 °C/min, and remained at 200 °C for 5 min, and then was continued to increase to 250 °C at rate of 10 °C/min, with a final stage of 10 min at 250 °C. The essential oils were placed in a glass capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm) filled with Rtx-5MS, and the oven temperature was programmed from 50 °C to 250 °C at a 5 °C/min dynamic rate, and remained for 15 min at 250 °C.

### 2.4. Identification of essential oil composition

Identification of components was performed by comparing their relative retention index (RI) determined with the reference of a homologous series of *n*-alkanes (C<sub>8</sub> to C<sub>24</sub>) [8-13]. The fragmentation patterns of the mass spectra were compared with the WILEY and NIST 05 libraries. The linear temperature-programmed RIs of all the constituents were calculated based on the GC through the interpolation between bracketing *n*-alkanes as follow:

$$RI = 100 \times \left[ \frac{t_{R(i)} + t_{R(Z)}}{t_{R(Z+1)} + t_{R(Z)}} Z \right]$$

where *Z* was the number of carbon atoms in the smaller *n*-alkane, and *t<sub>R(i)</sub>*, *t<sub>R(Z)</sub>* and *t<sub>R(Z+1)</sub>* were the retention time of the desired compound, the smaller *n*-alkane and the larger *n*-alkane, respectively [14].

## 3. Results

The yield of the greenest essential oil extracted by hydrodistillation from aerial parts of *C. cinerea* was 0.282% (v/w). The results of GC-MS analysis showed the identification of 33 constituents representing 98.66% of the total oil composition. As shown in Table 1, the major compounds were (E)-citral (24.01%), limonene epoxide cis- (18.26%), thymol methyl ether (15.04%), carvacrol (15.03%), trans-carveol (13.79%), carvone (3.06%) and trans-piperitol (2.54%)

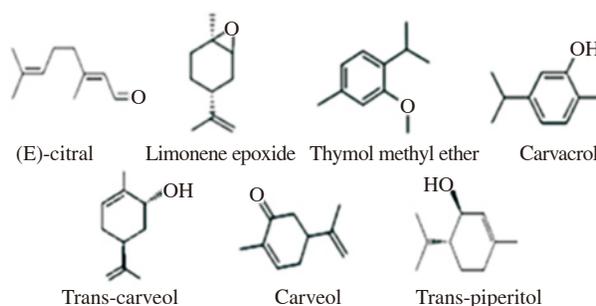
(Figure 2). The oil composition was dominated by the presence of oxygenated monoterpenes (95.40%) followed by monoterpene hydrocarbons (2.17%), oxygenated sesquiterpenes (0.68%) and sesquiterpene hydrocarbons (0.41%).

**Table 1**

Chemical composition of *C. cinerea* essential oils.

No.	RT	Name of compounds	Formula	Area (%)	KI
1	10.93	Unknown	-	0.02	912.07
2	14.28	α-fenchene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.26	958.09
3	17.54	α-phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.08	1002.44
4	19.43	Limonene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.98	1024.47
5	20.52	(E)-β-ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.41	1037.17
6	21.14	(Z)-β-ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.14	1044.40
7	21.86	Cis-dihydromultifidene	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub>	0.25	1052.79
8	22.45	(Z)-sabinyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	1.18	1059.66
9	23.80	Terpinolene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.05	1075.39
10	24.10	Linalool oxide II (pyran)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	0.13	1078.89
11	26.39	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.61	1105.53
12	27.62	Limonene epoxide cis-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	18.26	1119.73
13	35.48	Trans-piperitol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	2.54	1210.91
14	35.83	Thymol methyl ether	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	15.04	1215.10
15	36.64	Trans-carveol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	13.79	1224.82
16	36.80	Carvone	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	3.06	1226.73
17	37.94	(E)-citral	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	24.01	1240.40
18	40.88	Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	15.03	1275.65
19	42.75	Bornyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1.15	1298.08
20	47.59	Geranyl acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0.60	1359.61
21	50.01	β-Elementene	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	0.15	1390.44
22	50.78	Bornyl isobutyrate	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	tr	1400.26
23	52.10	Trans-caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.16	1417.86
24	53.28	Caryophyllene B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.04	1433.60
25	56.07	Neryl isobutyrate	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	0.05	1470.80
26	57.58	Bicyclgermacrene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.44	1490.94
27	59.91	(Z)-nerolidol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.10	1522.57
28	61.86	Nerolidol trans-	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.21	1549.22
29	62.28	Germacrene B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.06	1554.96
30	64.55	Scapanol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.12	1586.00
31	65.41	Geranyl isopentanoate	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	0.11	1597.75
32	67.90	Unknown	-	0.27	1636.54
33	70.01	α-Bisabolol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.06	1669.70
34	71.85	Unknown	-	0.28	1698.61
35	73.07	Farnesol (isomer 2)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	0.03	1717.87
36	74.53	Bisabolol oxide A	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	0.05	1740.93
Grouped compounds					
Monoterpene hydrocarbons				2.17	
Oxygenated monoterpenes				95.40	
Sesquiterpene hydrocarbons				0.41	
Oxygenated sesquiterpenes				0.68	

RI: Retention indices relative to C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> *n*-alkanes on the Rtx-5MS column; RT: Retention time; KI: Kovats index.



**Figure 2.** The major compounds of essential oil composition.

## 4. Discussion

The essential oils from the aerial part of the species *C. cinerea* have been studied and described in the literature by several groups

because of their interesting biological properties and varying bioactive compounds. Studies from El Bouzidi *et al.* and Kasrati *et al.* described trans-thujone (41.4%), cis-verbenyl acetate (24.7%), 1,8-cineole (8.2%) and camphor (5.5%) as the major components of the plants collected in Morocco[15,16], while Atef *et al.* described 3-carène (30.99%), thujone (21.73%), santolina triene (18.58%) and camphor (6.21%) from the oil obtained from a specimen collected in the Oued Souf Sahara in southeast of Algeria[17]. These essential oils have very different compositions from the essential oil extracted from the aerial parts of *C. cinerea* presented in this study, with the major compounds of (E)-citral (24.01%), limonene epoxide cis- (18.26%), thymol methyl ether (15.04%), carvacrol (15.03%), trans-carveol (13.79%), carvone (3.06%) and trans-piperitol (2.54%). These qualitative and quantitative differences in the chemical composition of essential oils could be attributed to several factors such as geographical location, the climatic effects, harvest season, nature of the soil, age of the plant parts (young or adult), the state of used plant materials (dried or fresh), the part of the plant used, time of collection and chemotype[18-20]. The oxygenated monoterpenes were found to be the major group in essential oil of *C. cinerea*, constituting 95.40%, and reported to be responsible for the antimicrobial activity of several essential oils[21,22]. This activity can justify the use of this plant in traditional medicine by the local people of Northern Sahara.

In conclusion, the essential oil of the aerial parts of *C. cinerea* was analyzed by GC-MS. (E)-citral, limonene epoxide cis-, thymol methyl ether, carvacrol, trans-carveol, carvone and trans-piperitol were the major constituents of the oil comprising 24.01%, 18.26%, 15.04%, 15.03%, 13.79%, 3.06% and 2.54%, respectively, of the total compounds present.

The main constituents of the aerial part essential oil of the plant from southwest of Algeria were different from that collected from southeast of Algeria or in Morocco. These data present the existence of different chemotypes for this species[23].

### Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

### References

- [1] Hamada D, Ladjel S. Chemical composition, *in-vitro* anti-microbial and antioxidant activities of the methanolic extract of *Anvillea radiata* Asteraceae. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2015; **6**(2): 1367-73.
- [2] Djellouli M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L, Belabbes A, Badraoui M, et al. Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of south west Algeria. *Asian J Nat Appl Sci* 2013; **2**(2): 59-65.
- [3] Talibi I, Amkraz N, Askarne L, Msanda F, Saadi B, Boudyach EH, et al. Antibacterial activity of Moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker. *J Med Plants Res* 2011; **5**(17): 4332-8.
- [4] Dendougui H, Seghir S, Jay M, Benayache F, Benayache SB. Flavonoids from *Cotula cinerea* Del. *Int J Med Arom Plants* 2012; **2**(4): 589-95.
- [5] Markouk M, Redwane A, Lazrek HB, Jana M, Benjama A. Antibacterial activity of *Cotula cinerea* extracts. *Fitoterapia* 1999; **70**(3): 314-6.
- [6] Ozenda P. [*Flora of the Sahara*]. Paris: French National Center for Scientific Research; 1983, p. 270. French.
- [7] Metrouh-Amir H, Duarte CMM, Maiza F. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. *Ind Crops Prod* 2015; **67**: 249-56.
- [8] Comai S, Dall'Acqua S, Grillo A, Castagliuolo I, Gurung K, Innocenti G. Essential oil of *Lindera neesiana* fruit: chemical analysis and its potential use in topical applications. *Fitoterapia* 2010; **81**(1): 11-6.
- [9] Davies NW. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *J Chromatogr A* 1990; **503**: 1-24.
- [10] Paolini J, Costa J, Bernardini AF. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005; **1076**(1-2): 170-8.
- [11] De Falco E, Mancini E, Roscigno G, Mignola E, Tagliatalata-Scafati O, Senatore F. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under different growth conditions. *Molecules* 2013; **18**(12): 14948-60.
- [12] Lone SH, Bhat KA, Bhat HM, Majeed R, Anand R, Hamid A, et al. Essential oil composition of *Senecio graciliflorus* DC: comparative analysis of different parts and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. *Phytomedicine* 2014; **21**(6): 919-25.
- [13] Maggi F, Bramucci M, Cecchini C, Coman MM, Cresci A, Cristalli G, et al. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia* 2009; **80**(6): 313-9.
- [14] Jalali-Heravi M, Moazeni-Pourasil RS, Sereshti H. Elimination of chromatographic and mass spectrometric problems in GC-MS analysis of lavender essential oil by multivariate curve resolution techniques: improving the peak purity assessment by variable size moving window-evolving factor analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015; **983-984**: 83-9.
- [15] El Bouzidi L, Abbad A, Fattarsi K, Hassani L, Leach D, Markouk M, et al. Chemical composition and anticandidal properties of the essential oil isolated from aerial parts of *Cotula cinerea*: a rare and threatened medicinal plant in Morocco. *Nat Prod Commun* 2011; **6**(10): 1491-4.
- [16] Kasrati A, Alaoui Jamali C, Bekkouche K, Wohlmuth H, Leach D, Abbad A. Comparative evaluation of antioxidant and insecticidal properties of essential oils from five Moroccan aromatic herbs. *J Food Sci Technol* 2015; **52**(4): 2312-9.
- [17] Atef C, Boualem M, Cherif MM, Youcef H, Azzedine C. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils in xerophytic plant *Cotula cinerea* Del (Asteraceae) during two stages of development: flowering and fruiting. *J Appl Pharm Sci* 2015; **5**(3): 29-34.
- [18] Ben Marzoug HN, Romdhane M, Lebrhi A, Mathieu F, Couderc F, Abderraba M, et al. *Eucalyptus oleosa* essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules* 2011; **16**(2): 1695-709.
- [19] Pirbalouti AG, Ghahfarokhi BB, Ghahfarokhi SAM, Malekpoor F. Chemical composition of essential oil from the aerial parts and underground parts of Iranian valerian collected from different natural habitats. *Ind Crops Prod* 2015; **63**: 147-51.
- [20] El-Akhal F, El Ouali Lalami A, Ez Zoubi Y, Greche H, Guemmouh R. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; **4**(9): 746-50.
- [21] Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum coticum* essential oil. *Iran J Microbiol* 2011; **3**(4): 194-200.
- [22] Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* 1995; **78**(3): 264-9.
- [23] Tadrent W, Kabouche A, Touzani R, Kabouche Z. Chemotypes investigation of essential oils of "Guertoufa" herbs. *J Mater Environ Sci* 2014; **5**(4): 1200-5.

## ETHNOPHARMACOLOGICAL STUDY AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF THREE PLANTS (ASTERACEAE FAMILY) FROM THE REGION OF SOUTH WEST ALGERIA

Mohammed Djellouli<sup>1</sup>, Abdellah Moussaoui<sup>2</sup>, Houcine Benmehdi<sup>3</sup>, Laid Ziane<sup>4</sup>, Abdelghani Belabbes<sup>5</sup>, Messaouda Badraoui<sup>6</sup>, Nawel Slimani<sup>7</sup>, Nourddine Hamidi<sup>8</sup>.

<sup>1-3</sup>Laboratory of Valorization of Vegetal Resource and Food Security in Semi-Arid Areas, South West of Algeria, University of Bechar, <sup>4-8</sup>Chemistry Laboratory, University of Bechar, ALGERIA.

<sup>1</sup> [amine\\_841@hotmail.com](mailto:amine_841@hotmail.com)

### ABSTRACT

*Anvillea Radiata, Cotula Cinerea and Matricaria Pubescens* are plants belonging to Asteraceae family, they are commonly used in traditional medicine in south west of Algeria (northern Sahara), for the treatment of several diseases. The aqueous extracts of the aerial parts (leaves and stems) of these plants were subjected to phytochemical screening tests to demonstrate the existence of natural products (alkaloids, saponins, flavonoids, terpens ... etc.) the secondary metabolisms of these may have pharmacological and therapeutic properties.

**Keywords:** *Anvillea Radiata, Cotula Cinerea et Matricaria Pubescens*, Bioactive extract, Phytochemical screening

### INTRODUCTION

Because of their therapeutic properties, medicinal plants are one way of investigation the most interesting image of the discovery of new drugs from plants used in traditional medicine for the treatment of discharged diseases.

*Anvillea Radiata, Cotula Cinerea and Matricaria Pubescens* are among the most used plants in traditional medicine in the northern Sahara, they are mentioned in the ethnobotanical surveys conducted by (Maiza. 1993) and (Ould El Hadj. 2003) in Algeria and (El Rhaffari U) in Morocco. These endemic Plants are much responded in the south western Algeria.

The aim of this work is to make a pre-ethnobotanical survey and assessment of chemical bioactive extracts of these three plants by phytochemical screening.

### Botanical description of the studied plants

The three studied species are endemic; their types are common throughout the northern and central Sahara and widely used and known by the locals of the area of southwest Algeria. *Anvillea Radiata* Coss et Dur: Vernacular name (*Nogde*), very branching shrub 20-50 cm, woody base stem and branches, elongated triangle leaves, attenuated at the base in to a petiole, and lamina strongly dentate surrendered large, 4 to 5 cm in diameter including long ligules, surrounded by radiating upper leaves gradually passing the bracts, these tough, yellow-orange flowers all; glitter truncated at the top of the receptacle and a long silka chenes prismatic those from the periphery to three angle from the center of those surrendered four corner devices flowers ligules long, up to 25 mm (Figure 1). [1]

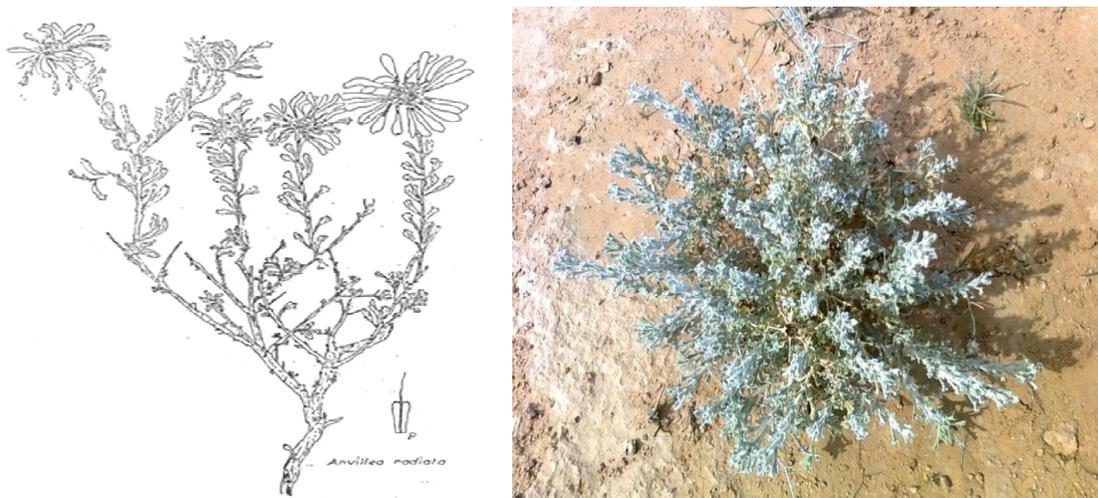


Figure 1. General morphology of Anvillea Radiata [1].

The species *Cotula Cinerea* (Del) : Vernacular name (*Guetoufa*), small whitish woolly plant leaves, thick, divided in their upper part to a 3-5 obtuse teeth; stems 10-40 cm, lying then recovered; capitula of 6 to 10 mm diameter, involucre woolly with a tubular flowers, brown buds and became golden yellow (Figure 02). [1]

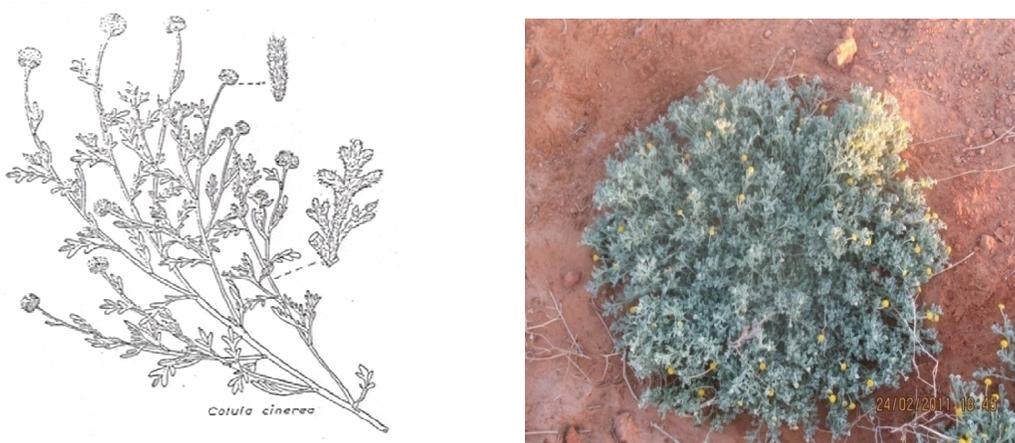


Figure 2. General morphology of Cotula Cinerea [1].

The species *Matricaria Pubescens* (Desf): Vernacular name (*Quazouaza*), endemic species, well known in the southwest area of Algeria, the stems are lying then recovered, tufted, cutsheets and a hairy dark green involucre scaled with a wide margin membranous, all flowers in tubes; achene topped with a membranous scales longer than it self, rejected on one side and having the appearance of a ligule (Figure 03). [1]



Figure 3. General morphology of Matricaria Pubescens[1].

### DESCRIPTION OF BÉCHAR REGION

Béchar area is located in the southwest of Algerian territory; it is bounded on the east by Adrar region, to the west by the Kingdom of Morocco, to the north by Naama and El Bayadh and to the south by Tindouf and Adrar.



Figure 04 : Location of BECHAR area in yellow on the map of Algeria

Béchar wilaya is located about 1000 km in the South-West of the capital Algies precisely on the border between Algeria and Morocco. This region extends over an area of 161,400 km<sup>2</sup>, or about 6.77% of the national territory, the wilaya of Béchar occupies the 6th place over all wilayas of Algeria. Its climate is hot and dry in summer and very cold in winter, rainfall doesn't exceeding 100 mm per year. The population is estimated at more than 251,657 inhabitants (2005 statistics). The Arabic language is the official language [8].

#### Plant material, extraction and phytochemical screening

The aerial parts of species , *Anvillea Radiata*, *Cotula Cinerea* and *Matricaria Pubescens*, collected in January to December, from the mountains, Lahmar City and Boukaisse city (30 to 50 km far away from Bechar), the plants have been identified and deposited in the Valorization of Resource and Food Security in Semi-Arid Areas Laboratory, South West of Algeria, University of Bechar.

The collected parts (leaves and stems) were washed, sorted and dried two months at room temperature. Then being finely pulverized using a mill blade. Extraction using soxhlet apparatus; reflux for 3 hours was performed. The residue was evaporated in vacuo apparatus, and according to the operative fashions of chemical screening one determines the present natural product in bioactive extract [6]. The high light of the main natural products is performed by standard techniques of written by (N. DOHOU. 2003) [3]. The phytochemical screening results are shown in Table 02.

### THE PHYTOCHEMICAL SCREENING METHODOLOGY

This ethno pharmacological investigation realized in the town of Bechar, during two months, failing to the pin inquiry, including one hundred persons. Questionnaire include question on vernacular name, plant parts used, the plant part from (dried or fresh), medicinal use of plant medicinal preparation methods and the taken dose. Gross-checked by interviewing old people aged between 60 and 75 years old, who had traditional knowledge about plants [6].

The results of the survey are included in Table 01 with a comparison of our results and those of other investigations.

### RESULTS AND DISCUSSION

#### Therapeutic Use of Plants *Anvillea Radiata*

This plant is widely used in traditional medicine in the region for the treatment of several diseases including: diabetes, Indigestion, cold, the stomach aches and the pulmonary diseases. The leaves and stems are the most used parts.

#### Therapeutic Use of *Cotula Cinerea*

Several diseases are treated by this such as: Colic, Cough, Diarrhoea, Headache, and Digestive Disorders. All parts of the plant are used.

#### Therapeutic Use of *Matricaria Pubescens*

This plant is used in the treatment of the following diseases: Gastric Ulcer, Gas, Asthma, Cough, Allergy, Ocular disorders, rheumatism. All parts of the plant are used.

According to the treated diseases, the three plants are used in different forms: a) Maceration, b) Decoction, c) Infusion, or d) Inhalation

**Table 1. Survey Results and Comparison with other work**

		Traditional use	
		In Algérie	In Marocco
Plants	Our Survey (South West of Algerian)	Maiza. K & al [3] (Sahara septentrio	Ould elhadj M. DIDI & El Rhaffari U & al [3] (Sahara septentrional es (South est of Maroc
<i>Anvillea Radiata</i>	<a href="#">Diabetes</a> , <a href="#">Indigestic</a> <a href="#">Cooling Pulmonary</a> <a href="#">Cold and</a> <a href="#">Upset stomach</a>	<a href="#">Cooling Pulmonar</a> <a href="#">Diabetes</a> , <a href="#">Indigesti</a> Aches.	<a href="#">Cooling Pulmonary</a> , <a href="#">Indigestion</a> , Gastro enteritis, spasms and colic, hepatitis, arthritis, <a href="#">cold and</a> <a href="#">cold</a> , <a href="#">Diabetes</a> , <a href="#">Upset stomach</a> , Leucorrhoea.
<i>Cotula Cinerea</i>	<a href="#">Colic</a> , <a href="#">Cough</a> , <a href="#">Diarr</a> <a href="#">Migraine and</a> <a href="#">Headache</a> , <a href="#">Disorders</a> <a href="#">Digestive</a> , <a href="#">Gastric Ulcer</a> ,	Sunstroke, <a href="#">Colic</a> , <a href="#">Cough</a> , Colds Broncho- Pulmonary <a href="#">Cough</a> , <a href="#">Allergy</a> , <a href="#">Rheumatism</a> ,	<a href="#">Colic</a> , <a href="#">Diarrhea</a> , <a href="#">Cough</a> , Cooling Broncho-Pulmonary Dysmenorrhea,, <a href="#">Cough</a> , <a href="#">Ocular Disorders</a> , Kidney pain
<i>Matricaria Pubescen</i>	<a href="#">Gas</a> , <a href="#">Asthma</a> , <a href="#">Cough</a> , <a href="#">Allergy</a> , <a href="#">Rheumatism</a> , <a href="#">Ocular Disorders</a> ,	<a href="#">Ocular Disorders</a> , Aches, Dehydration, Teething, Dysmenorrhea.	<a href="#">Digestive disorders</a> , <a href="#">Migraine</a> , <a href="#">headache</a> , Fever <a href="#">Gastric Ulcer</a> , <a href="#">Gas</a> , Indigestion, <a href="#">Asthma</a> , Conjunctivitis

[Convergence of the results of the fourths surveys](#)

[Convergence of the results of our survey with the results of other investigations in Algeria](#)

[Convergence of the results of our survey with the results of the Moroccan investigation](#)

### The non-convergence of the results

It was noted that there is a convergence between the results of our investigation and the results of other surveys, this traditional therapeutic use agreement is probably due to the nomads movement between the two countries, transmitting their knowledge during their travels local populations [3], or probably this convergence results from the strong emigration of the Algerians in the colonial period (the revolution war) to the Moroccan territory.

### Results of the phytochemical screening

- The Alkaloids are present in significant amount in *Anvillea Radiata* and in an average quantity in *Cotula Cinerea*, the lowest amount is represented in *Matricaria Pubescens*.
- The Saponins are present in large quantities in *Anvillea Radiata*, *Cotula Cinerea* and *Matricaria Pubescens* have an average amount.
- Terpenoids, Tannins, Flavonoids, Steroids and Cardenolides are present in significant amounts in all of the species studied with an

average amount in tannins in *Matricaria Pubescens* and an average quantity Cardenolides in *Cotula Cinerea* and the smaller amounts in Flavonoids and presents at *Anvillea Radiata*.

**Table 2. Results of the phytochemical screening**

Natural products	Medicinal plants		
	<i>Anvillea Radiata</i>	<i>Cotula Cinerea</i>	<i>Matricaria Pubescens</i>
Alcaloids	+++	+	++
saponins	+++	++	++
Terpens	+++	+++	+++
Tanins	+++	++++	++
Flavonoides	++	+++	++
Free Flavonoids	+	++	++
Heterosids Flavonoids	+	+++	++
Glycosidic Flavonoids	+	+++	+++
Steroids	+++	+++	+++
Cardenolids	+++	++	+++

+++ : important Presence, ++ : average Presence and + : weak presence

## CONCLUSION

The ethno pharmacological Survey conducted in Béchar region, from the Algerian South west, shows that the three plant species (*Anvillea Radiata*, *Cotula Cinerea* and *Matricaria Pubescens*) are widely used in traditional medicine in the area, in various forms of medicinal preparations, they are used to treat various diseases (diabetes, Indigestion, cold, upset stomach and the cooling lung using the plant *Anvillea Radiata*; Colic, cough, diarrhea, Migraine, headaches and digestive disorders using the plant *Cotula Cinerea* and ulcer gastric, gas, asthma, cough, Allergies, Ocular Disorders and rheumatism using the *Matricaria Pubescens* plant).

The therapeutic effects are induced by various chemical compounds (Alkaloid, Flavonoids, Terpenoids, Saponins, Sterols and Tannins). Which constitute the scientific basis for the traditional therapeutic use of the tested plants [10].

Our results can be used for the purification of the active principle of plants studied in further research for the preparation of improved forms of effective remedies based on these plants [9].

## REFERENCES

- [1] Ozenda, P. (1967). Flore du Sahara, Pat, 270.
- [2] Fellah, S., Romdhane, M. & Abderraba, M. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia Officinalis*.1 cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*. 16(2), 193-202.
- [3] Maiza, K., De La, B., Perriere, R. A. & Hammiche, V. (1996). Pharmacopée Traditionnelle Saharienne : Sahara septentrional. *Journal Médicaments et Aliments :L'Approche Ethnopharmacologique*. 169.
- [4] Ould, E. I., Hadj, M., Didi, Hadj-Mahammed, M. & Zabeirou H. (2003). Place Des Plantes Spontanées Dans la Médecine Traditionnelle de la Région de Ouargla (Sahara Septentrional est). *Journal Courrier du Savoir – N°03*, pp. 47-51
- [5] El Rhaffari, U. & Zaid, A. (2002). *Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet)*. UN savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Congrès Européen D'Ethnopharmacologie. IRD; SFE, 2002, p. 293-318
- [6] Ziane, L., Lazouni, H. A., Moussaoui, A. & Hamidi, N. (2013). Ethnopharmacology and Phytochemical screening of Bioactive Extracts of *Limonastrum Feei* ( Plombaginaceae). *Asian Journal of natural and applied sciences*, 2(1).
- [7] Ghourri M., Zidane, L. & Douira, A. (2013). Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal &Plant Sciences*, 17(1): 2388-2411.
- [8] Site officielle de Wilaya de BECHAR.
- [9] De Souza, C., Koumaglo, K. E. & Gbeassor, M. (1995). Evaluation des propriétés Antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de quelques plantes médicinales. *J Pharm. Méd. Trad . Afr*. PP 103-112.
- [10] Koffi, N., GUESSAN, KADJA, B., Guédé, N., ZIRIHI, TRAORÉ, D. & AKÉ-ASSI, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1) : 1 – 15.
- [11] Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A. & Gmira, N. (2003). Screening Phytochimique d'une Endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea Lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 142, 61-78.