



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE 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 Es-Sciences en Chimie

Spécialité: *Chimie Organique Appliquée*

Par :

M^{elle} Karima BECHLAGHEM

Sur le thème

**Etudes Chimiques Et Biologiques Des Extraits Préparés à partir de
Quelques Espèces De Cistacées Poussant En Algérie**

Soutenue le 09.09.2020 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Saïd GHALEM	Pr. Univ. Abou Bekr BELKAID, Tlemcen	Président
Mr Omar KHAROUBI	Pr. Univ. Oran1 Ahmed BEN BELLA, Oran	Examineur
Mr Smaine BOUSALEM	Pr. Centre Univ. Bouchaïb BELHADJ, Ain-Témouchent	Examineur
Mr Hamadi Abderrahmane LAZOUNI	Pr. Univ. Abou Bekr BELKAID, Tlemcen	Examineur
Mr Houcine BENMEHDI	Pr. Univ. Mohammed TAHRI, Béchar	Co-Directeur de thèse
Mr Hocine ALLALI	Pr. Univ. Abou Bekr BELKAID, Tlemcen	Directeur de thèse

*Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO)
B.P 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

Dédicaces

A la mémoire de ma chère mère qui a quitté ce monde pendant que je préparais ma thèse.

A la mémoire de mon cher père qui lui aussi n'est plus de ce monde, il nous a quitté bien longtemps...

A la mémoire de mon oncle Habib...

A mes frères et sœurs ;

A mes belles sœurs et à mes beaux frères ;

A mes neveux et nièces que je chéris beaucoup à savoir :

« Zineb, Mohcine, Nourhène, Isam, Nizar, Nassima, Djawed, Anas et Sirine »

Aux chers lecteurs

Remerciements

J'ai l'immense plaisir de présenter mes sincères remerciements:

Au Directeur de thèse,

Professeur Hocine ALLALI,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse et l'honneur de m'avoir suivie dans sa réalisation. Votre rigueur, vos critiques ainsi que votre disponibilité m'ont été très utiles pour mener à bien ce travail. Veuillez trouver ici ma profonde reconnaissance.

Au co-Directeur de thèse,

Professeur Houcine BENMEHDI,

Je vous remercie pour tous vos conseils, votre disponibilité et vos encouragements. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Au président du jury,

Professeur Saïd GHALEM, Directeur du Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO) de l'Université de Tlemcen.

Je vous remercie vivement d'avoir accepté de présider ce jury. Vous étiez très généreux avec moi en me permettant l'accès au laboratoire chaque samedi et en mois de Juillet. Veuillez trouver ici ma respectueuse considération.

Au Professeur **Omar KHAROUBI** de l'Université d'Oran,

Je vous adresse mes plus sincères remerciements pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Au Professeur **Smain BOUSALEM** du Centre Universitaire d'Ain Témouchent,

Je vous remercie pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Au Professeur **Hamadi Abderrahmane LAZOUNI** de l'Université de Tlemcen,

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez apporté à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes sincères remerciements sont adressés aussi pour :

Professeur Guido FLAMINI, du Département de Pharmacie de l'Université de Pise d'Italie, pour la réalisation des analyses chromatographiques des huiles essentielles.

Docteur Houria MEDJDOUB (Maître Conférence « A »), du Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, pour son aide apporté dans les tests de l'activité antioxydante et antidiabétique.

Docteur Nadia AISSAOUI, du Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, pour la réalisation des tests de l'activité antimicrobienne.

Docteur Zahra SALAH, du Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, pour la réalisation des tests de l'activité insecticide.

Mme Hafida HASNAOUI, ingénieur des forêts au Parc National de Tlemcen (plateau de Lalla Setti) pour l'orientation et la documentation.

Docteur Ibrahim BABALI, du Département de Biologie de l'Université de Tlemcen, pour l'identification botanique des espèces étudiées.

A tout les membres des équipes de recherches au sein du LASNABIO, sans oublier **Kheira** notre gentille technicienne.

A tout les Professeurs de l'Enseignement Moyen à « Benhabi Hocine», Ouzidane.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude pour tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Table des matières

	Pages
Introduction Générale	1
Chapitre I : Huiles Essentielles, Mode d’Obtention, Caractérisation et Activités Biologiques	
I. 1 Introduction.....	3
I. 2 Situation économique des plantes aromatiques et médicinales.....	3
I.2-a / A l’échelle mondiale.....	3
I.2-b / En Algérie.....	3
I.2- c / Secteur des huiles essentielles en Algérie.....	5
I.3 Huiles essentielles.....	6
I.3.1 Introduction.....	6
I.3.2 Utilisation des huiles essentielles.....	6
I.3.3 Propriétés biologiques des huiles essentielles.....	7
I.3.4 Techniques d’extraction des huiles essentielles.....	7
I.3.5 Composition chimique des huiles essentielles.....	10
I.3.6 Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles.....	12
I.3.7 Méthodes de caractérisation chimique.....	12
I.3.7.1 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)	12
I.3.7.2 Chromatographie en Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM).....	12
I.3.7.3 Techniques de chromatographie multidimensionnelle.....	13
I.3.7.4 Analyse CPG en espace de tête.....	13
I.3.7.5 Identification par combinaison de la RMN du Carbone-13.....	14
I.3.7.6 Base de données en CPG/SM.....	14
I.4 Activité antioxydante des extraits de plantes médicinales.....	15
I.4.1 Introduction.....	15
I.4.2 Oxydation et antioxydants.....	15
I.4.3 Défense antioxydante.....	16
I.4.3.1 Systèmes de défense enzymatique	17
I.4.3.2 Systèmes de défense non enzymatique	17
I.4.4 Pouvoir antioxydant des huiles essentielles.....	20
I.4.5 Méthodes de mesure de l’activité antioxydante (Méthodes <i>in vitro</i>).....	20
I.4.5.1 Test DPPH.....	21

I.4.5.2 Test FRAP.....	22
I.4.5.3 Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique (Test du blanchiment du β -carotène).....	23
I.5 Activité antimicrobienne.....	23
I.5.1 Introduction.....	23
I.5.2.Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	23
I.5.3 Tests de sensibilité antimicrobienne « <i>in- vitro</i> »	24
I.5.3.1 Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes).....	24
I.5.3.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	25
I.6 Activité enzymatique: Inhibition de l' α - amylase.....	26
I.6.1 Introduction.....	26
I.6.2 Traitement du diabète.....	26
I.6.3 α -amylase : Mécanisme d'action, Inhibition.....	26
I.6.4 Effet antidiabétique des plantes médicinales : mode d'action, principes actifs à effet hypoglycémiant.....	28
I.6.5 Evaluation de l'activité inhibitrice de l' α -amylase.....	29
I.7 Activité insecticide.....	29
I.7.1 Introduction.....	29
I.7.2 Situation actuelle en Algérie	30
I.7.3 Production mondiale du pois chiche	30
I.7.4 Production nationale du pois chiche.....	30
I.7.5 Maladies et ravageurs des stocks de légumineuse.....	31
I.7.6 Moyens de lutte	33
I.7.6.1 Insecticides de contact.....	33
I.7.6.2 Fumigants	33
I.7.7. Utilisation des plantes insecticides : Action des huiles essentielles	34
I.7.8 Evaluation du pouvoir insecticide des extraits de plantes.....	35
Références Bibliographiques.....	36

CHAPITRE II

Recherche Bibliographique sur les Cistes

II.1 Introduction.....	47
II.2 Présentation de la famille des Cistacées.....	47

II.3 Description botanique des trois espèces de cistes.....	48
II.3.1 <i>C. ladaniferus</i> L.....	48
II.3.2 <i>C. albidus</i> L.....	49
II.3.3 <i>C. monspeliensis</i> L.....	49
II.4 Pratique traditionnelle et usage des plantes étudiées.....	50
II.5 Usage et application des cistes en industrie.....	50
II.6 Etude chimique des extraits de <i>C. ladaniferus</i> L., <i>C. albidus</i> L., et <i>C. monspeliensis</i> L.....	51
II.6.1 introduction	51
II.6.2 Etude chimique	51
Références Bibliographiques	55

CHAPITRE III

Matériels et Méthodes

III. 1 Introduction	59
III.2 Zone et période de récolte.....	59
III.3 Extraction des huiles essentielles.....	59
III.4 Analyse des huiles essentielles par CPG et CPG/SM.....	60
III.5 Evaluation des activités biologiques.....	61
III.5.1 Activité antioxydante	61
III.5.1.1 Test DPPH.....	61
III.5.1.2 Méthode de la réduction du Fer (FRAP).....	62
III.5.1.3 Test de blanchiment de β -carotène.....	63
III.5.2 Activités antimicrobiennes.....	63
III.5.2.1 Microorganismes et conditions de culture.....	60
III.5.2.2 Méthode de diffusion sur disque.....	64
III.5.2.3.Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	65
III.5.3 Evaluation de l'activité enzymatique.....	66
III.5.3.1 Préparation des réactifs.....	66
III.5.4 Activité insecticide.....	67
III.5.4.1 Elevage des insectes.....	68
III.5.4.2 Evaluation de la toxicité des huiles essentielles sur <i>C.maculatus</i>	68
Références Bibliographiques	71

Chapitre IV

Résultats et Discussion

IV. 1 Analyse chimique de quelques espèces du genre <i>Cistus</i>	73
IV.1.1 Introduction.....	73
IV.1.2 Extraction des huiles essentielles des cistes.....	73
IV.1.3 Composition chimique des huiles essentielles.....	73
IV.1.4. Travaux antérieurs sur la composition chimique des huiles essentielles.....	81
IV.2 Etude de l'activité biologique des huiles essentielles.....	83
IV.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	83
IV.2.1.1. Introduction.....	83
IV.2.1.2 Test du piégeage du radical libre DPPH.....	84
IV.2.1.3 Test de réduction du Fer (FRAP).....	86
IV.2.1.4 Test de décoloration du β -carotène.....	87
IV.2.2 Mesure de l'activité antimicrobienne.....	93
IV.2.2.1 Introduction.....	93
IV.2.2.2 Méthode de diffusion sur disque.....	93
IV.2.2.3 Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	95
IV.2.3 Evaluation de l'activité antidiabétique.....	104
IV.2.3.1 Introduction.....	104
IV.2.3.2 Activité inhibitrice de l' α -amylase.....	104
IV.2.4 Activité insecticide.....	108
IV.2.4.1. Introduction.....	108
IV.2.4.2 Evaluation de la mortalité des adultes de <i>C. maculatus</i> par les huiles essentielles.....	108
IV.2.4.3 Comparaison de la toxicité des huiles essentielles des trois cistes sur les adultes de <i>C. maculatus</i>	111
Références Bibliographiques	115
Conclusion Générale	121

Liste des Figures

- Fig.01 :** **a-** Evolution du volume des exportations des huiles essentielles (statistiques du commerce extérieur agricole) ; **b-** Huiles essentielles, Oléorésines et Résinoïdes exportées.
- Fig.02 :** Hydrodistillation par Clevenger et hydrodistillation assistée par micro-ondes.
- Fig. 03 :** Schéma explicatif de l'extraction avec le CO₂ supercritique
- Fig.04 :** Structures chimiques de quelques composants des huiles essentielles
- Fig.05 :** Défenses antioxydantes contre les différentes espèces réactives oxygénées
- Fig.06 :** Structures de quelques oxydants d'origine alimentaires
- Fig.07 :** Structure chimique du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
- Fig.08 :** Structure chimique du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine
- Fig.09 :** Réduction du (Fe^{III} –TPTZ) en (Fe^{II} – TPTZ)
- Fig.10 :** Aromatogramme (Schéma simplifié)
- Fig.11 :** Plaque à microtitration
- Fig.12 :** Hydrolyse de l'amidon catalysé par l'α-amylase
- Fig.13 :** Enchainement 1-4 dans les liaisons glycosidiques de l'amylose et structure chimique de l' acarbose.
- Fig.14 :** Deux formes distinctes de *C. maculatus* identifiés dans la nature ; Infestation du pois chiche par *C. maculatus*
- Fig.15 :** Structures chimiques de quelques pesticides chimiques
- Fig.16 :** Photos de *C. ladaniferus* L.
- Fig.17 :** Photos de *C. albidus* L.
- Fig.18:** Photos de *C. monspeliensis* L.
- Fig.19 :** Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les extraits de : *C. ladaniferus* L., *C. monspeliensis* et *C. albidus* ,trouvées dans la littérature.
- Fig.20 :** Structures chimiques de quelques composés majoritaires des huiles essentielles des espèces étudiées (**CL** : *C. ladaniferus* ; **CA** : *C. albidus* ; **CM** : *C. monspeliensis*)
- Fig.21 :** Montage d'hydrodistillation de type Clevenger.
- Fig.22 :** Schéma explicatif de la méthode de microplaque.
- Fig.23 :** Elevage de masse de *C.maculatus*
- Fig.24 :** Effet des huiles essentielles sur *C.maculatus*
- Fig.25 :** Composés majoritaires caractérisés dans les huiles essentielles de *C. ladaniferus*
- Fig.26:** Composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *C. albidus*

Fig.27 : Composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *C. monspeliensis*

Fig.28 : Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur

Fig.29 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*) en fonction des concentrations.

Fig.30 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CA (*C. albidus*) en fonction des concentrations.

Fig.31 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CM (*C. monspeliensis*) en fonction des concentrations.

Fig.32 : Variation du pourcentage d'inhibition de la Vit C (acide ascorbique) en fonction des concentrations.

Fig.33 : Mesure de l'absorbance des solutions d'huiles essentielles par le test FRAP

Fig.34 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*), CA (*C. albidus*) et CM (*C. monspeliensis*) ; Vit C (Vitamine C).

Fig.35 : Mesure de l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène

Fig.36 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*) en fonction des concentrations

Fig.37 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CA (*C. albidus*) en fonction des concentrations

Fig. 38 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CM (*C. monspeliensis*) en fonction des concentrations

Fig. 39: Variation du pourcentage d'inhibition du BHT en fonction des concentrations.

Fig.40 : Méthode de diffusion sur disque (zone d'inhibition de la croissance de quelques souches bactérienne. (**HE** : Huile Essentielle ; **CL** : *C. ladaniferus* ; **CA** : *C. albidus* ; **CM** : *C. monspeliensis*).

Fig.41 : Evaluation de l'activité inhibitrice de l' α -amylase.

Fig.42: Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*) en fonction des concentrations.

Fig.43: Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CA (*C. albidus*) en fonction des concentrations

Fig.44: Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CM (*C. monspeliensis*) en fonction des concentrations.

Fig.45: Variation du pourcentage d'inhibition de l'acarbose en fonction des concentrations.

Fig.46 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de *C.ladaniferus*.

Fig.47 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de *C.monspeliensis*.

Fig.48 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de *C.albidus*.

Fig.49 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de l'insecticide chimique (Decis, 25 EC).

Fig.50 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses des huiles essentielles de *C.ladaniferus*.

Fig.51 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses des huiles essentielles de *C.albidus*.

Fig. 52 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses des huiles essentielles de *C.monspelienensis*.

Fig.53 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses de l'insecticide chimique (Decis, 25 EC).

Liste des Tableaux

Tableau 01. Plantes aromatiques et médicinales les plus consommées en Algérie.

Tableau 02. Composés majoritaires des huiles essentielles des espèces étudiées.

Tableau 03. Données géographiques et climatiques des zones d'études.

Tableau 04. Rendement des huiles essentielles des différents cistes.

Tableau 05. Composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *C. ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis*

Tableau 06. Activité antioxydante des huiles essentielles exprimées en CI_{50} .

Tableau 07. Activité antioxydante des huiles essentielles de *C. ladaniferus*, *C. albidus*, *C. monspeliensis* et BHT exprimée en CI_{50} .

Tableau 08. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. ladaniferus*

Tableau 09. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. albidus*

Tableau 10. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. monspeliensis*

Tableau 11. Zones d'inhibition et les CMI des antibiotiques standards

Tableau 12. Potentiel hypoglycémiant *in vitro* des huiles essentielles de *C. ladaniferus* (CL) ; *C. albidus* (CA) ; *C. monspeliensis* (CM).

Tableau 13. Mortalité des adultes de *C. maculatus* (témoin).

Tableau 14. Valeurs des DL_{50} et D_{90} ($\mu L/10g$ de graines) calculées

Liste des abréviations

BHT : Hydroxytoluène butylé

BHA : Hydroxyanisole butylé

PG : Galatte de propyle

UV : rayonnement ultraviolet

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

GSH : Glutathion

ADN : Acide désoxyribonucléique

β -CAR : β -carotène

h : heure

Trolox : Acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

CLHP : Chromatographie en Phase Liquide à haute Performance

DL₅₀ : Dose létale pour 50% de la population d'insectes

DL₉₀ : Dose létale pour 90% de la population d'insectes

rpm : rotation par minute

DMSO : Diméthylsulfoxyde

TBHQ : (Butyl hydroquinone tertiaire)

UI/ mL : Unités Internationales par millilitre

Introduction Générale

Introduction Générale

L'Algérie possède un grand potentiel floristique caractérisé par une grande biodiversité offrant ainsi des opportunités de développement durable aux générations futures. Cependant la gestion et la valorisation de ce patrimoine restent à développer et à renforcer.

Le secteur des plantes aromatiques et médicinales « PAM » est un secteur porteur pour l'économie du pays. Les organismes de recherches et universitaires contribuent d'une part à la préservation des « PAM ». Des laboratoires de recherches scientifiques ont été créés dans le but de valoriser ce secteur afin de l'exploiter dans divers domaines, notamment pour renforcer la production pharmaceutique, agricole et cosmétique.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre du programme de recherche de notre laboratoire celui des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), qui s'intéresse à la valorisation de la flore de la région de Tlemcen pour la découverte de nouvelles molécules à pouvoir antioxydant, antimicrobien, insecticide, etc.

Notre étude vise à étudier trois espèces méditerranéennes appartenant à la famille des Cistacées: *Cistus ladaniferus*, *Cistus albidus* et *Cistus monspeliensis*. Ces plantes poussent à l'état spontané dans la région de Tlemcen, elles sont connues sous le nom de « *touzala* ».

Le choix de ces espèces est basé sur une étude ethnobotanique dans la région de Tlemcen, elles sont utilisées en médecine traditionnelle. D'autre part, très peu d'études sur les cistes ont été réalisées en Algérie.

L'étude chimique des huiles essentielles de la partie aérienne des trois cistes est présentée pour la première fois dans ce travail.

Les objectifs suivants ont été fixés :

- ✓ Analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles des trois espèces par CPG et CPG/SM afin d'énumérer leurs profils chimiques.
- ✓ Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles par trois méthodes : test DPPH, test FRAP et le test de blanchissement de la β -carotène.
- ✓ Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sur différentes souches pathogènes.
- ✓ Etude de l'activité antidiabétique *in vitro* des huiles essentielles (inhibition de l' α -amylase).

Introduction Générale

- ✓ Etude de l'activité insecticide des huiles essentielles sur un bruche nuisible des stocks de denrées alimentaires (*Callosobruchus maculatus*).

Notre recherche sera par la suite, comparée avec d'autres travaux publiés par les pays voisins (Maroc, Tunisie) et ceux des pays méditerranéens : Espagne, Portugal, France, Italie, etc.

Ce travail a été accompli en collaboration avec les universités et les laboratoires de recherches suivants :

- ✓ Département de Pharmacie, Université de Pise, Italie.
- ✓ Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédicale et à l'Environnement (LAMMABE), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie.
- ✓ Laboratoire de Valorisation des Actions de l'Homme pour la Protection de l'Environnement et Application en Santé Publique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou bekr Belkaïd, Tlemcen, Algérie.

Et la collaboration du:

- ✓ Park National de Tlemcen et l'Association Forêt Modèle, Tlemcen.

CHAPITRE I

**Huiles Essentielles, Mode d'Obtention,
Caractérisation & Activités Biologiques**

I. 1 Introduction

Le marché mondial des huiles essentielles est en croissance régulière, soutenu par la diversité des secteurs d'application de ces extraits. Les laboratoires de recherches scientifiques du pays (notre laboratoire à titre d'exemple, celui des Substances Naturelles et Bioactives) s'intéressent depuis une décennie à l'extraction et la caractérisation des molécules bioactives, notamment les huiles essentielles connues pour leurs vertus thérapeutiques et leurs utilisations en industrie alimentaire et en parfumerie, etc.

I. 2 Situation économique des plantes aromatiques et médicinales

I.2.a- A l'échelle mondiale

Une place importante a été accordée aux Plantes Aromatiques et Médicinales « PAM » dès les débuts des années 90, en raison d'une prise de conscience en faveur de la santé humaine, de l'environnement, de l'agriculture biologique, de la phytothérapie ainsi que l'aromathérapie [1]. D'autre part, la culture des « PAM » est considérée comme un moyen de substitution à une agriculture intensive dans les pays industrialisés et un moyen de diversification de l'activité agricole, offrant ainsi de l'emploi aux communautés rurales dans les pays du tiers monde [2].

Le secteur des « PAM » est un secteur industriel large, diversifié par le nombre d'espèces qu'ils englobent, il fait intervenir diverses technologies. Comparativement à d'autres productions agricoles, ce secteur est d'un poids économique faible et sensible aux changements du commerce international [3].

Le marché mondial des plantes a connu une hausse de 700 millions de tonnes soit trois milliards de dollars courant en 2013 et 2014. Il est dominé en volume et en valeur principalement par les Etats-Unis, Hong-Kong et la Chine. Le marché mondial a connu l'apparition de nouveaux importateurs, l'Inde et la Malaisie. La Chine avec Hong Kong dominant l'exportation, suivie des Etats-Unis avec 40% du total en volume des exportations et plus de 30% de la valeur des exportations. Il faut souligner la présence des pays tiers méditerranéens comme l'Egypte, le Maroc et l'Albanie. L'Egypte en particulier, entre les périodes (1994-2003) et (2004-2013), quadruple sa valeur des exportations et passe de 2% à 6% des parts du marché mondial, un taux annuel croissant de 8% en volume et 13% en valeur a été enregistré entre (2013-2014) [4].

I.2.b- En Algérie

La filière des « PAM » est peu développée en Algérie malgré que le pays dispose d'une large diversité variétale en « PAM ». Leurs utilisations populaires sont diverses dans l'ensemble

du territoire national. Les connaissances ancestrales sont transmises de génération en génération, les espèces les plus utilisées sont présentées dans le tableau suivant [4].

Tableau 1. Plantes Aromatiques et Médicinales les plus consommées en Algérie

Espèces	Nom scientifiques	Parties utilisées
Fenugrec	<i>Trigonella foenum groecum L.</i>	Graines
Verveine	<i>Verbena citriodora HB et K</i>	Feuilles
Réglisse	<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	Racines
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	Sommités fleuries
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	Sommités fleuries
Bigaradier	<i>Citrus bigaradia.</i> Duham	Feuilles et fleurs
Armoise blanche	<i>Artemisia herba-alba</i> Asso	Sommités fleuries
Sauge	<i>Salvia officinalis L.</i>	Sommités fleuries
Lavande	<i>Lavandula officinalis L.</i>	Fleurs
Myrte	<i>Myrtus communis L.</i>	Feuilles et fruits
Basilic	<i>Ocinum basilicum L.</i>	Sommités fleuries
Menthe verte	<i>Mentha verdis L.</i>	Feuilles
Menthe pouliot	<i>Mentha pulegium L.</i>	Sommités fleuries
Thym serpolet	<i>Thymus serpillum L.</i>	Sommités fleuries
Pétale de rose	<i>Rosa canina L.</i>	Pétales et fruits
Camomille	<i>Matricaria camomilla L.</i>	Fleurs
Nigelle	<i>Nigella sativa L.</i>	Graines
Anis vert	<i>Pimpinella anisum L.</i>	Graines
Rue	<i>Ruta montana L.</i>	Feuilles
Cumin	<i>Cuminum cyminum L.</i>	Graines

L'année 1941, fut l'année de la création du comité de contrôle de la répartition et de la vente des « PAM » en Algérie dans le but majeur de limiter les importations. Un répertoire a été publié en 1942 où 98 espèces ont été décrites.

La commercialisation des « PAM » dans le pays se fait à l'état brut ou à l'état d'huile essentielle, oléorésines et résinoïdes [5]. D'après Ilbert et collaborateurs [4], l'Algérie est quasiment absente des quinze premiers pays importateurs ou exportateurs, sa part du marché mondial est presque inexistante. Le pays a exporté un volume équivalent à 0,0007% du marché mondial en 2014, ce qui correspond à 3 tonnes de « PAM » soit 11 milles d'euros, destinés vers la France, le Pakistan, le Sénégal, le Mali et le Niger. En importation, pour la même année et d'après le Centre National de l'Informatique et Statistique (CNIS), une hausse de 17% en volume et 73% en valeur des importations en « PAM » a été enregistrée par rapport à l'année 2013. Les premiers fournisseurs de l'Algérie en « PAM » étant : le Pakistan, la Chine, la Turquie et l'Inde [4]. Néanmoins, depuis 2003 des projets pilotes ont été lancés afin d'encourager la culture des « PAM » pour le développement rural et l'amélioration des conditions de vie [5].

I.2. c- Secteur des huiles essentielles en Algérie

L'époque allant de 1970 à 1979 a été caractérisée par une orientation vers l'exportation des huiles essentielles, 94 kg d'huiles essentielles de jasmin « le jasmin d'Algérie classé 2^{ème} après celui de la Grèce » ont été exportés, soit 109 millions de centimes [6].

La période des années (1988 à 1995) est dominée par l'importation. Entre (2001-2005), les exportations restent insignifiantes et c'est à partir de 2006 qu'une reprise pour l'exportation est enregistrée avec 2823 kg soit 7644 US\$. Un pic correspondant à 22690 kg soit 998261 US\$ a été enregistré en 2008 (Figure 01-a) [5]. L'analyse des mouvements commerciaux entre les différentes huiles essentielles (Figure 01-b), montre que la moitié des exportations est assurée par l'huile essentielle des oranges. Les produits d'exportation (Huiles essentielles, oléorésines et résinoïdes) sont destinés vers le Canada, la France et la Belgique [5].

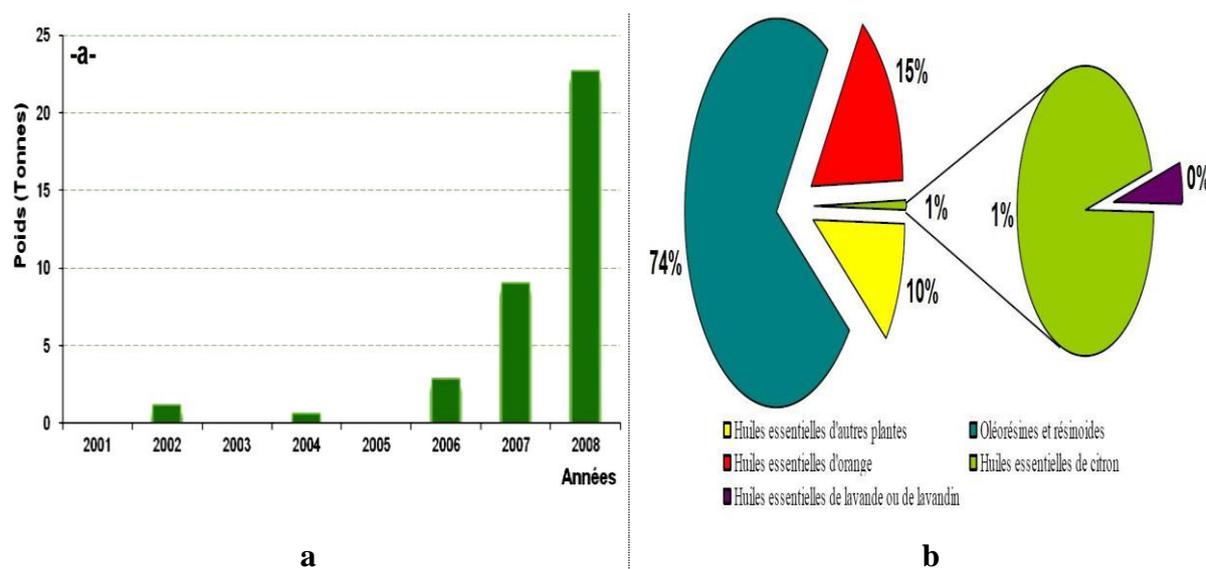


Fig. 01 : a- Evolution du volume des exportations des huiles essentielles; b- Huiles essentielles, oléorésines et résinoïdes exportées. (Statistiques du commerce extérieur agricole)

L'étude quantitative du secteur économique des huiles essentielles en Algérie, montre une faiblesse remarquable. Cependant, la richesse de la flore en « PAM » pourra améliorer ce secteur. Des stratégies doivent être mises pour la production des huiles essentielles de qualité qui pourront remplacer certaines importations.

I.3 Huiles essentielles

I.3.1 Introduction

L'utilisation des plantes pour se soigner remonte à des milliers d'années. Aujourd'hui, la phytothérapie est une solution alternative et complémentaire aux traitements de la médecine classique [7].

L'aromathérapie est une thérapeutique bien spécifique : « c'est une méthode de soin par les odeurs » [8]. L'huile essentielle appelée encore « essence aromatique végétale » est un produit pur de la partie odoriférante des plantes aromatiques [9].

Les huiles essentielles ont été utilisées depuis l'antiquité par toutes les civilisations pour des buts thérapeutiques, religieux ou cosmétiques. Lors des recherches archéologiques en Mésopotamie, des alambics enfouis remontant à plus de 7500 ans ont été retrouvés [7].

L'aromathérapie a été progressée par les Arabes. En effet, les nomades arabes cultivaient pendant leur transhumance des plantes aromatiques d'Asie sur tout le pourtour du bassin méditerranéen. Le grand savant Ibn Sīnā (Avicenne) a produit la première huile essentielle (celle des roses) par le moyen d'alambic [8].

Toutefois, le rôle de ces métabolites secondaires dans les plantes est de se défendre contre les agressions extérieures et d'attirer les insectes pollinisateurs [10-11].

I.3.2 Utilisation des huiles essentielles

De nos jours, considérées comme des composés à forte valeur ajoutée, les huiles essentielles sont destinées vers plusieurs secteurs d'activités. Environ 90% de la production des essences est destinée vers le secteur industriel, alimentaire et cosmétique [12].

Les huiles essentielles sont utilisées en agroalimentaire pour améliorer le goût des aliments et pour bien les conserver, grâce aux effets antimicrobiens et antioxydants de leurs constituants [10,13-14]. L'utilisation prolongée des antioxydants synthétiques comme le BHT, le BHA et le PG conduit à des effets néfastes pour la santé [15-16].

En pharmacie, les huiles essentielles sont utilisées comme agents antiseptiques et antifongiques. Les huiles essentielles sont souvent rajoutées à la composition des médicaments pour masquer leur mauvais goût [10].

En industrie chimique, les molécules d'intérêt sont isolées à partir des huiles essentielles pour les utiliser en hémi-synthèses. Les nouvelles molécules obtenues sont considérées plus rentables, en comparaison avec celles obtenues à partir de la synthèse chimique classique [10].

L'étude de Pibiri [17], a montré que l'usage des huiles essentielles est une solution d'avenir pour lutter contre la dissémination des germes dans les bâtiments équipés de système de ventilation, empêchant ainsi la contagion des occupants.

I.3.3 Propriétés biologiques des huiles essentielles

Plusieurs travaux sur les huiles essentielles de plusieurs espèces de différentes familles, ont énuméré des propriétés biologiques intéressantes: antiseptiques, insecticides, fongicides, bactéricides [18-22], anticancéreuses puissantes [23], antioxydantes [24-25], antivirales [26], anti-inflammatoires [27]. Les huiles essentielles sont considérées aussi comme des acaricides naturels [28].

En général, les huiles essentielles qui sont utilisées d'une manière contrôlée ne sont pas toxiques. Néanmoins, l'huile essentielle de certaines plantes comme l'essence de sabine, a montré des risques d'hémorragies utérines chez la femme et des hématuries chez l'homme [29].

I.3.4 Techniques d'extraction des huiles essentielles

Selon l'espèce, les huiles essentielles sont localisées dans différentes parties des plantes (feuilles, fleurs, bois, fruits ou encore dans les racines). Elles sont stockées dans les organes végétaux spécialisés des cellules sécrétrices (poches, canaux et poils sécréteurs) [30]. Les constituants de l'huile essentielle sont hydrophobes, souvent liquides à température ambiante et volatils [9].

La méthode la plus utilisée pour l'extraction des essences des sécrétions résineuses est l'hydrodistillation, mais il existe d'autres méthodes : l'extraction par solvant, la distillation par entraînement à la vapeur, l'expression, etc. [30]. La distillation est peu coûteuse, cependant elle est consommatrice d'eau et d'énergie.

Dans le souci d'améliorer les techniques d'extraction, d'optimiser les procédés existants et les innover, d'autres technologies économiques propres et durables ont été développées telles que les techniques utilisant les micro-ondes, les fluides supercritiques, les ultrasons, le solaire et la biomasse [5]. Le choix d'une technique par rapport à une autre dépend d'une meilleure optimisation en temps, en rendement et en coût de l'opération.

- **Hydrodistillation**

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé le plus ancien, connu par les égyptiens dès le IV^{ème} siècle. De nombreux dessins d'alambics ont été trouvés dans les hiéroglyphes dans le temple de Memphis. Les connaissances scientifiques arabes en distillation ont été importées en Europe entre le VIII^{ème} et le X^{ème} siècle [31].

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière végétale dans de l'eau, l'ensemble est porté ensuite à ébullition sous pression atmosphérique. Les substances odorantes sont libérées par éclatement des cellules végétales. Ces molécules aromatiques sont entraînées avec la vapeur d'eau, le distillat obtenu est refroidi et condensé dans un essencier. L'eau et les molécules aromatiques se séparent par différence de densité.

Au laboratoire, la distillation peut s'effectuer avec recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation, communément appelé cohabage. Le montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (muni d'une cohobe) suivant les normes de la pharmacopée européenne est appelée Clevenger (Figure 2) [32-33].

Le rendement, ainsi que la composition chimique des huiles essentielles sont influencés par plusieurs paramètres. L'étude de Fadil et collaborateurs [34], portant sur l'optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L., montre qu'une durée de 210 mn d'hydrodistillation et une durée de séchage de 8 jours, ainsi qu'un rapport eau/matière végétale compris entre 9 et 12 ($\times 100\text{g}/100\text{mL}$) et une température de chauffage entre 250 °C et 300 °C, suffisaient pour augmenter le rendement de l'extraction de 1,9% jusqu'à 2,3%.

- **Hydrodistillation assistée par micro-ondes**

C'est une technique récente, qui a été utilisée pour l'extraction des huiles essentielles de divers type de plantes telles que le romarin, la lavande, le laurier et le thym [35].

Une partie du montage d'hydrodistillation est placé dans le four micro-ondes. Le ballon contenant l'eau et la matière végétale est mis dans l'enceinte du four à micro-ondes (Figure 2) [32]. L'énergie provenant des rayonnements micro-ondes, se transforme en une énergie chauffante, qui accélère le processus d'extraction. Les huiles essentielles ainsi obtenues, sont récupérées dans la partie du Clevenger situé en dehors du four.

Les avantages de la technique sont diverses : extraction en temps rapide, une bonne qualité des extraits d'huiles avec un bon rendement, un coût minime et une préservation de la nature [36].

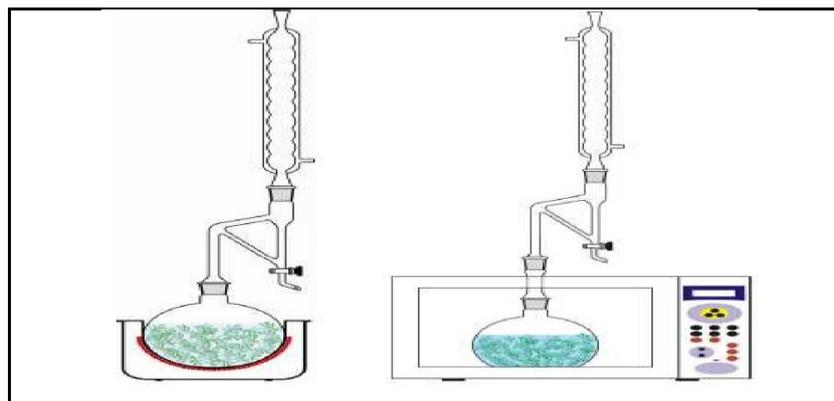


Fig.02 : Hydrodistillation par Clevenger (à gauche) et hydrodistillation assistée par micro-ondes (à droite)

- **Extraction au CO₂ supercritique**

L'extraction par CO₂ à l'état supercritique pour l'obtention des huiles essentielles des plantes, est un procédé qui est actuellement utilisé et qui a montré beaucoup d'avantages. Les procédés d'extractions conventionnels (hydrodistillation, extraction par solvant, etc.) nécessitent plus d'étapes pour séparer l'extrait. La partie de la plante est mise en contact avec le CO₂ supercritique. L'huile essentielle dissoute se sépare du fluide quand ce dernier redevient gazeux. Le CO₂ supercritique est non toxique, non combustible, pas cher et ses points critiques ne sont pas élevés (31,06°C, 73,82 bar). La température faible utilisée, permet de récupérer les composés sensibles à la chaleur. De plus, plusieurs composés des huiles essentielles comme les monoterpènes et les sesquiterpènes, ont montré une grande solubilité dans ce fluide [37].

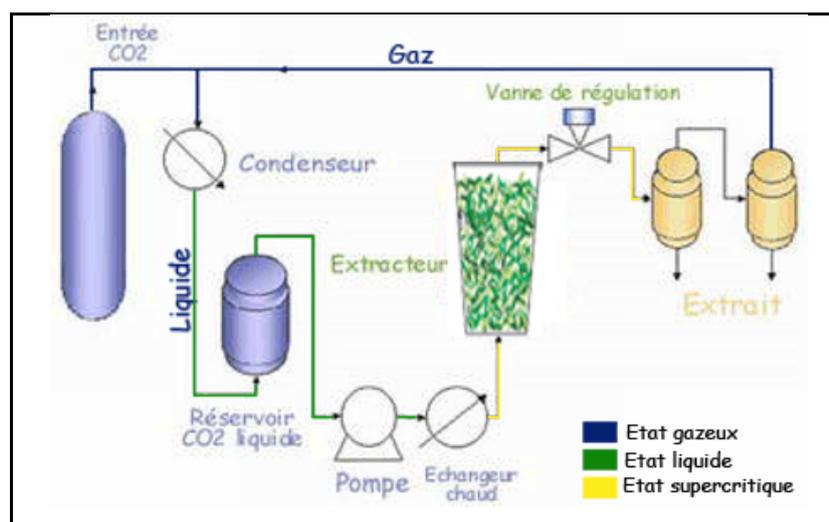


Fig.03 : Schéma explicatif de l'extraction avec le CO₂ supercritique
(Source : <http://tpe-huile-essentielle2013.e-monsite.com/pages/i-1/cat-5/>)

I.3.5 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont constituées par un mélange complexe de composés volatils à faible poids moléculaire. La composition chimique des huiles essentielles varie selon l'espèce et les différents composants sont classés selon leurs structures chimiques en :

- **Terpènes et Terpénoïdes**

Avec plus de 22.000 structures chimiques connues, les terpènes constituent probablement la classe la plus vaste des composés organiques végétaux. Ils sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires tels que la photosynthèse, la croissance, la reproduction et la défense cellulaire [25].

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures de structures variées, dérivant d'unités isopréniques (issues elles mêmes du métabolisme du glucose) de formule générale $[C_5H_8]_n$. Les plus prépondérants dans les huiles essentielles étant les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}) et les diterpènes (C_{20}). D'autres dérivés comme les alcools, les aldéhydes, les cétones, les esters, les éthers, les phénols et les peroxydes sont considérés comme des terpénoïdes [38].

- **Phénylpropènes**

Les phénylpropènes sont une sous classe des phénylpropanoïdes biosynthétisés dans les plantes à partir de l'acide aminé « la phénylalanine ». Ces composés volatils sont moins fréquents que les terpènes, toute fois l'eugénol et le saffrole (deux composés les plus caractéristiques de ce groupe) se trouvent les plus majoritaires dans la composition chimique de plusieurs espèces [38-39].

- **Autres composés**

Les huiles essentielles contiennent d'autres composés de natures variées issus de la dégradation de molécules peu ou pas volatils. La dégradation des acides gras insaturés linoléique et linolénique, conduit à des alcools, des aldéhydes et des acides de faible masse moléculaire. Nous retrouvons parfois des composés soufrés ou azotés comme l'allicine et l'isothiocyanate d'allyle dans la composition chimique des huiles essentielles [10,38].

Les caroténoïdes sont une autre classe de molécules d'isoprénoïdes en C_{40} , polyinsaturés avec plus de 15 doubles liaisons en chaînes. Plus de 700 structures chimiques ont été identifiées. Ces molécules sont responsables de la couleur jaune, orange et rouge de plusieurs fruits et légumes.

L'auto-oxydation des carotènes (un sous groupe des caroténoïdes), conduit à la formation des norisoprénoïdes (C_{13}) représentés majoritairement par les ionones [40-42].

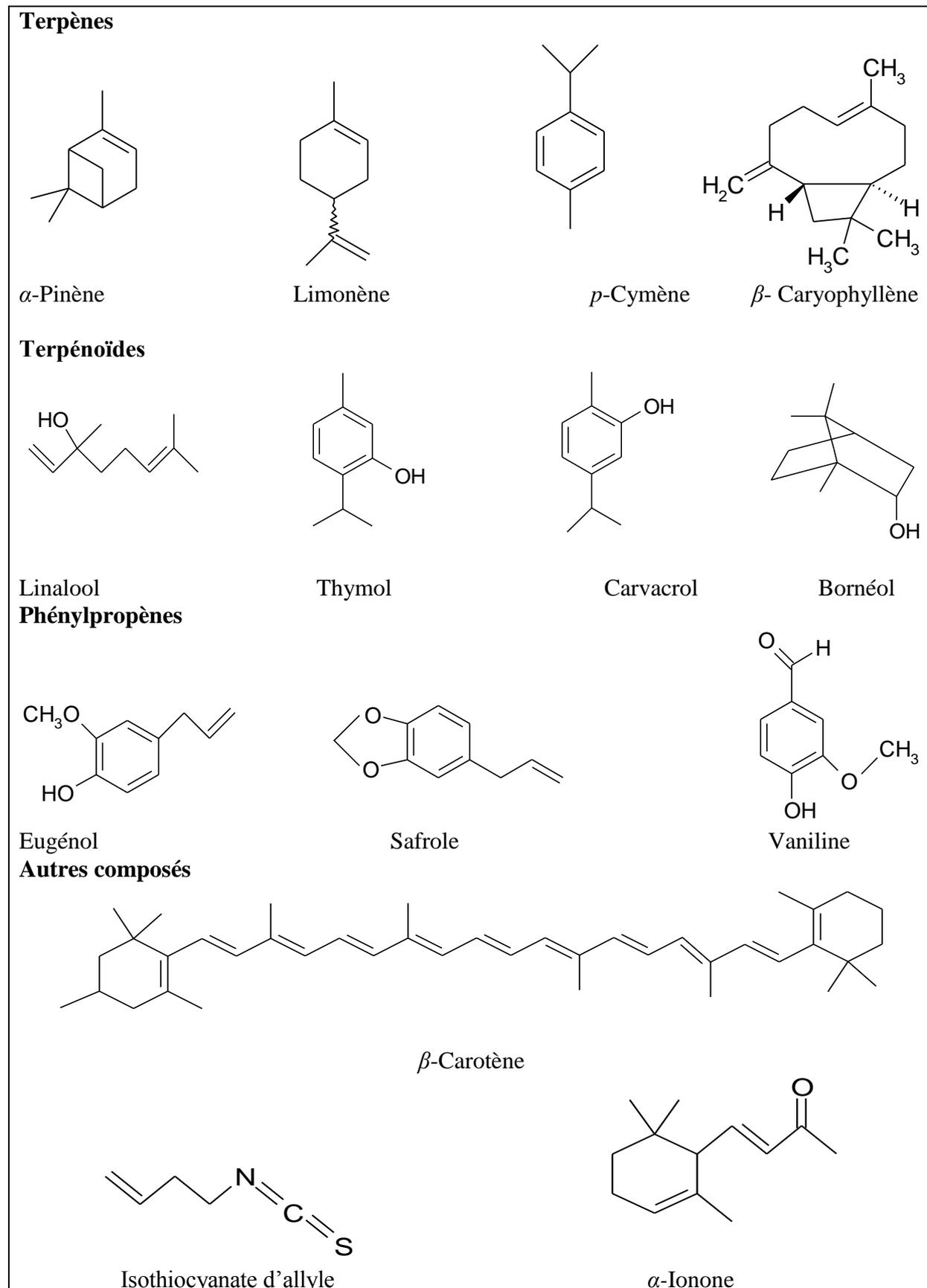


Fig.04 : Structures chimiques de quelques composants des huiles essentielles
(Source : WebBook de Chimie NIST)

I.3.6 Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles

Il est intéressant d'étudier les facteurs intervenant sur la composition chimique d'une huile essentielle, vu l'intérêt que portent les consommateurs des huiles essentielles, que ça soit en industrie qui cherche un bon rendement lors de l'extraction de molécules spécifiques, ou en aromathérapie qui cherche une huile dotée de tous ses vertus. Ces facteurs sont nombreux et le plus souvent liés à l'environnement de la plante (nature du sol, ensoleillement, humidité, sécheresse, etc.). Le cycle végétatif est lui-même un facteur propre à la plante, déterminant la variabilité chimique de l'huile essentielle. D'autres facteurs interviennent, notons la saison de récolte, le moment de la journée, la technique d'extraction et les conditions de stockage [10].

I.3.7 Méthodes de caractérisation chimique

I.3.7.1 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Pour séparer différentes espèces chimiques d'un mélange complexe et pour identifier et quantifier les espèces isolées, la chromatographie reste un moyen extrêmement puissant.

Le principe de toutes les méthodes chromatographiques reste le même : chaque espèce se partage de façon différente des autres entre deux phases, une stationnaire qui peut être un solide ou un liquide greffé sur un support solide et une phase mobile soit gazeuse (Chromatographie en Phase Gazeuse) ou liquide (Chromatographie en Phase Liquide) [43].

La CPG est la méthode la plus couramment utilisée pour identifier la composition chimique des huiles essentielles. En effet, la chromatographie en phase gazeuse capillaire à haute résolution avec ses phases stationnaires spécifiques, est l'atout pour résoudre les problèmes liés à la séparation des produits volatils des huiles essentielles. La méthode permet un couplage des chromatographes à divers spectromètres, par conséquent la quantité et la qualité des informations obtenues seront augmentées. Les détecteurs de masse (MS), à ionisation de flamme (FID) et le détecteur infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sont les plus utilisés [44].

I.3.7.2 Chromatographie en Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

Dans le domaine des huiles essentielles et des arômes, la CPG/SM permet de séparer, identifier et quantifier des substances présentes en très petite quantité. L'identification du composé se fait par comparaison de son spectre de masse avec celui d'une bibliothèque informatisée [44,45], à condition que le niveau de similitude des spectres inconnus et ceux de référence, soit suffisant et que les indices de rétention soient identiques dans des conditions opératoires comparables [46].

- **Conditions analytiques et procédures** [47]

Les conditions analytiques ainsi que les procédures d'analyses en analyse chimique des huiles essentielles doit être décrite minutieusement :

- ✓ Appareil (pays de fabrication, numéro de modèle) ;
- ✓ Type des colonnes et dimensions ;
- ✓ Débit du gaz vecteur ;
- ✓ Conditions de programmation de la température : température de l'injecteur, température du détecteur et de la colonne ainsi que les spectres de masse.

I.3.7.3 Techniques de chromatographie multidimensionnelle

- **Couplage CPG-CPG**

La technique de chromatographie multidimensionnelle (CPG-CPG) est destinée à séparer des mélanges complexes. Elle utilise généralement deux colonnes de polarité différente avec un système de modulateur, qui assure le piégeage des analytes élués de la première colonne vers la 2^{ème} colonne. Ces techniques offrent une excellente résolution chromatographique et des seuils de détection très bas, elles sont généralement couplées à la spectroscopie de masse [48].

- **Couplage CPG/SM/SM**

Un SM/SM consiste en une source d'ionisation, deux analyseurs de masse séparés par une cellule de fragmentation et un détecteur d'ions. La molécule analysée est ionisée puis l'ion parent formé est sélectionné par le premier analyseur de masse. L'ion est fragmenté par collision avec les molécules du gaz contenu dans la cellule de collision (dissociation induite par collision). Les ions fils obtenus sont séparés dans le second analyseur de masse.

La SM/SM couplée à la CPG permet l'identification et la quantification des produits à l'état de traces dans des mélanges complexes. En effet, pour l'analyse des molécules aromatiques, la CPG/SM/SM s'est révélée être une technique alternative à la CPG/SM. Ce couplage a permis l'identification de plusieurs sesquiterpènes de l'huile essentielle de vétiver d'une très grande complexité. Le couplage a permis aussi de différencier des diastéréoisomères du dihydrocarvéol [49].

I.3.7.4 Analyse CPG en espace de tête [46]

L'étude des volatiles est faite par une analyse CPG en espace de tête. Le principe de la méthode consiste à analyser la phase gazeuse en équilibre avec l'échantillon solide mis en atmosphère confiné. Les composés volatils sont piégés par adsorption sur un polymère hydrophobe puis libérés par une désorption thermique dans l'injecteur du chromatographe.

I.3.7.5 Identification par combinaison de la RMN du Carbone-13 [50]

Dans le domaine des huiles essentielles, l'utilisation d'autres méthodes analytiques complémentaire comme la RMN a fait objet de plusieurs recherches. L'RMN est une technique recommandée pour l'identification de molécules caractéristiques dans des huiles essentielles complexes. Elle a été adaptée pour :

- ✓ Identifier des composés difficilement séparables par la CPG ;
- ✓ Identifier des sesquiterpènes et des stéréoisomères aux indices de rétention très proches (l'identification des isomères du menthol, du dihydrocarvéol et leurs acétates dans les huiles essentielles de menthe poivrée et de menthe verte, a été réalisée par RMN du Carbone-13) ;
- ✓ A étudier la variabilité chimique d'une huile essentielle, en effet l'RMN couplée à la CPG et la CPG/SM a permis l'identification de trois types chimiques dans les huiles essentielles de *Tymus carnosus*.

I.3.7.6 Base de données en CPG/ SM [48]

De vastes bibliothèques de spectres de masse sont disponibles, on distingue :

- Les bibliothèques de spectres commerciales qui sont vendues par les constructeurs de spectres de masse ou par des éditeurs. Les plus connues étant la NIST (*National Institut of Standard and Technology*) et la WILEY (célèbre éditeur scientifique). Les spectres de masse répertoriés correspondent à des molécules dont la caractérisation intéresse plusieurs domaines d'activités : pesticides, médicaments, polluants, etc.

La banque de spectres « Robert Adams » regroupe des molécules impliquées dans l'industrie des parfums et des arômes. En plus des spectres de masse, le temps de rétention des composés est inclus dans cette bibliothèque dans des conditions chromatographiques bien définies. Ceci est considéré comme un avantage car c'est plus facile de différencier des isomères de terpènes par leurs temps de rétention que par leurs spectres de masse.

- Les bibliothèques de spectres personnelles par contre sont construites au laboratoire et sont dédiées exclusivement aux molécules d'intérêt pour le laboratoire. Le spectre cible est enregistré sur le même spectromètre dans les mêmes conditions que les spectres de masse de référence.

I.4 Activité antioxydante des extraits de plantes médicinales

I.4.1 Introduction

L'intérêt aux sources naturelles d'antioxydants pour protéger les cellules de l'organisme de l'effet des radicaux libres, ainsi qu'en industrie pour prévenir la détérioration des produits alimentaires et cosmétiques, s'est accru ces dernières années. En effet les recherches scientifiques ne cessent de se développer pour identifier des antioxydants à partir des extraits de plantes médicinales et des produits agroalimentaires [51-52].

I.4.2 Oxydation et antioxydants

Les radicaux libres sont des agents oxydants qui réagissent spontanément avec d'autres atomes ou molécules pour initier des réactions en chaînes indispensables au fonctionnement normal de notre organisme. Ces substances jouent un rôle majeur dans beaucoup de fonctions cellulaires : synthèse de l'acide arachidonique, transfert des électrons au niveau des chaînes mitochondriales, élimination des toxiques et les défenses anti-infectieuses et anti-tumorales [53-54]. Cependant, une production excessive des radicaux libres dans l'organisme humain provoque le « stress oxydatif ». Ce terme est utilisé pour décrire une situation de dommage provoqué par ces agents oxydants aux fonctions métaboliques. Les macromolécules cibles étant les glucides, les protéines et les lipides [54-55]. Plusieurs maladies impliquant le stress oxydant ont été recensées : l'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, le diabète, l'obésité, le cancer, la colite ulcéreuse, l'athérosclérose et l'inflammation [56-58].

Les radicaux libres « nocifs » sont produits en cas d'exposition à diverses agressions de l'environnement (pollution, rayonnement UV, fumée des cigarettes, etc.) [55], au stress, à l'abus excessif de l'alcool, à la prise de pilule contraceptive et à l'inflammation chronique [59].

L'existence des radicaux libres a été mise en évidence la première fois par des chimistes de l'association des producteurs de caoutchouc britanniques la fin des années 1930. Ils ont pu résoudre à travers cette découverte, le mystère du vieillissement du caoutchouc. Dr Denham Harman, a émis l'hypothèse en 1954 que le même type de vieillissement affecte les êtres vivants [60].

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO). Parmi ces espèces on distingue :

- Les radicaux primaires : espèces radicalaires (avec un électron impair) tels que le radical hydroxyle (OH•), le radical alkoxy (RO•), le radical peroxyde (ROO•) et le radical monoxyde d'azote (NO•).

- Les espèces non radicalaires (dites secondaires) : tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'oxygène singulet (1O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$). Ces espèces se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés chimiques de la cellule [61-62].

I.4.3 Défense antioxydante

Les antioxydants sont une famille de composés qui agissent comme des protecteurs chimiques. Ils empêchent les espèces réactives de l'oxygène d'atteindre leurs cibles biologiques (Figure 05), prévenant ainsi la survenue des maladies associées au stress oxydant [56].

Un antioxydant est défini comme une substance présente en petite concentration par rapport à la concentration d'un substrat oxydable, retarde ou prévient l'oxydation de ce substrat [63].

L'organisme dispose d'un système vaste et complexe de défense contre les ERO (Figure 05) [64] :

- Des antioxydants endogènes : enzymes (Superoxyde dismutase, Glutathion peroxydase, Catalase, etc.), protéines (Albumine, Céruloplasmine, etc.).
- Des antioxydants de petite taille (Glutathion, Acide urique, etc.).
- D'autres antioxydants sont le plus souvent apportés par l'alimentation (Vitamines, Polyphénols, Caroténoïdes) et les oligo-éléments (Sélénium, Cuivre et le Zinc).

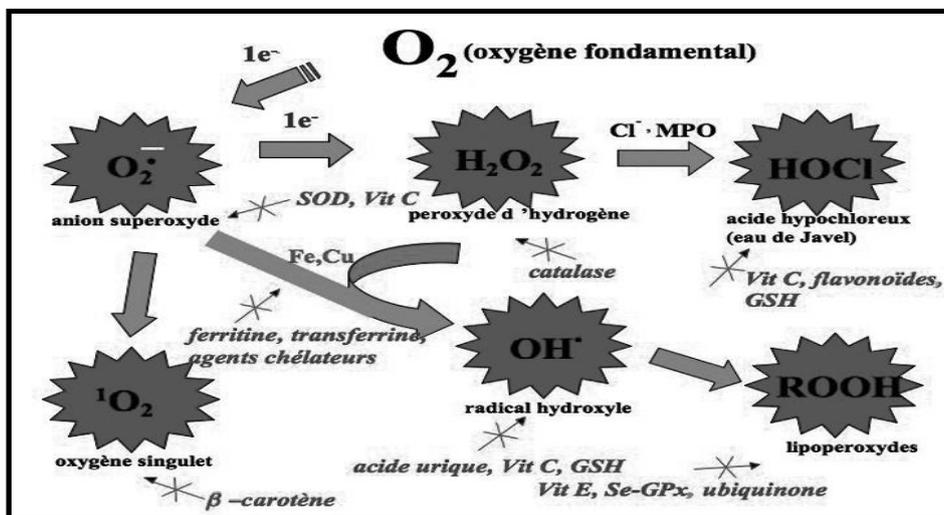
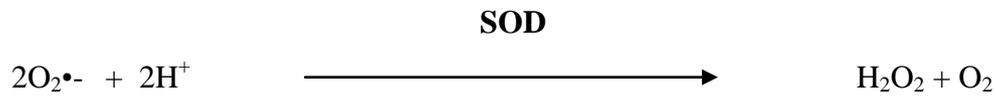


Fig.05 : Défenses antioxydantes contre les différentes espèces réactives oxygénées (SOD : Superoxyde dismutase ; Cl^- : Anion chlorure, MPO : Myéloperoxydase ; GSH : Glutathion, Se-GPx : Séléno-glutathion peroxydase)

I.4.3.1 Systèmes de défense enzymatique

- **Superoxydes dismutases (SOD)**

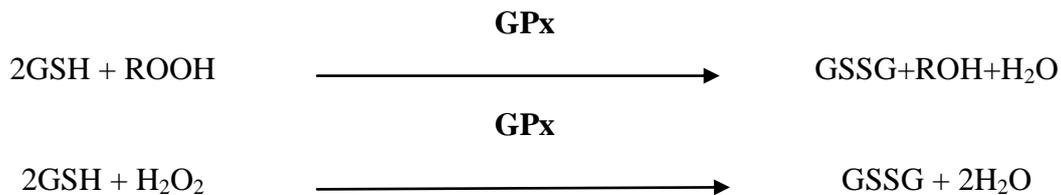
Ces métalloprotéines éliminent l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène par une réaction de dismutation.



Chez l'être humain, trois enzymes à cofacteurs métalliques ont été décrites : Cu/ Zn-SOD₁ cytosolique, Cu/ Zn-SOD₂ mitochondriale, Cu/ Zn- SOD₃ (paroi artérielle) [64].

- **Glutathion peroxydase (GPx)**

La GPx est une sélénoprotéine, l'activité enzymatique de la GPx se trouve principalement dans les cytoplasmes des cellules eucaryotes, en éliminant les hydroperoxydes lipidiques (ROOH) et non lipidique H_2O_2 [65].



- **Catalase**

Cette enzyme est présente dans les peroxysomes des cellules eucaryotes, elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène [65].



I.4.3.2 Systèmes de défense non enzymatiques

- **Glutathion, protéines - thiols**

Le glutathion est l'acide glutamique-cystéine-glycine, c'est le thiol majoritaire au niveau intra-cellulaire (GSH). Il est chélateur des métaux de transition, cofacteur de la GPx, il régénère la vit E et C. D'autres protéines (qui possèdent des groupements thiols comme l'albumine) sont aussi réactives envers les ERO [64].

- **Antioxydants d'origine alimentaire**

Sont diverses, les plus connus étant :

- **Les vitamines**

La vitamine E (α -tocophérol) est l'antioxydant majeur des peroxydations lipidiques, elle protège les bases nucléotidiques des brins de l'ADN et des protéines, contribuant ainsi à la lutte contre les formes réactives de l'oxygène. Elle joue aussi un rôle important dans la prévention des maladies cardio-vasculaires.

Les éléments d'origine végétale les plus riches en vitamine E étant les céréales et les huiles végétales (Maïs, blé, huile de tournesol, huile de noisette, etc.). La vitamine E existe aussi sous forme synthétique [66-67].

La vitamine C est un excellent piègeur des ($\text{HO}\cdot$ ou $\text{O}_2\cdot^-$), elle régénère la vitamine E en inhibant la peroxydation lipidique et joue un rôle important dans le renforcement du système immunitaire. La vitamine C contribue à la synthèse du collagène, protège l'endothélium capillaire, les globules rouges et les leucocytes [64-68].

- **Les polyphénols**

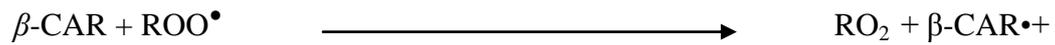
Les polyphénols constituent un groupe très important des métabolites secondaires produits par les plantes. Ces molécules organiques sont subdivisées en plusieurs classes, y compris les stilbènes, lignanes et les flavonoïdes. Plusieurs études ont montré que les polyphénols dans les fruits, les légumes et les plantes médicinales sont une source de composés à activités antioxydantes remarquables. Ces substances sont reconnues comme des chélateurs d'ions métalliques, réparateurs des dommages oxydatifs de l'ADN et comme agents anti-inflammatoires [69-70].

L'activité antioxydante des composés phénoliques est due principalement à leurs propriétés redox en réduisant les agents donneurs d'hydrogène et en éliminant l'oxygène singulet [58]. Il a été montré aussi que les polyphénols ont une meilleure activité antioxydante *in vitro* que celle de la vitamine C et E [71]. Des études (*in vitro* et *in vivo*) menées sur des souris exposées aux UV, ont montré que l'administration des polyphénols aux souris prévenait la survenue des cancers cutanés [70].

- **Les caroténoïdes**

Se sont des pigments de couleur variante de l'orange au rouge orangé appartenant à la famille des terpénoïdes. Parmi six cents caroténoïdes identifiés, une soixantaine de composés sont des provitamines A, notamment l' α , β , γ -carotène et la cryptoxanthine.

Les caroténoïdes contribuent au renforcement du système de défense cellulaire contre les radicaux libres (l'oxygène singulet et les radicaux peroxydes). Le β -carotène à titre d'exemple est très réactif vis-à-vis les $\text{ROO}\cdot$:



Cette activité antioxydante est due à la présence d'un système de double liaison conjuguée très large. Un apport important en caroténoïdes par l'alimentation diminue le survenu du cancer tels que le cancer du poumon, de l'œsophage, du sein, de la bouche et de la prostate. [72-74].

○ **Les oligo-éléments**

- **Le Sélénium** : cofacteur des glutathion peroxydase et thiorédoxine réductase. Il contribue à la prévention des dommages causés sur l'ADN par les radicaux libres.
- **Le Zink** : cofacteur du superoxyde dismutase, renforce le système immunitaire contre les UV et joue un rôle important dans le métabolisme des nucléotides et de la production des prostaglandines [64-70].

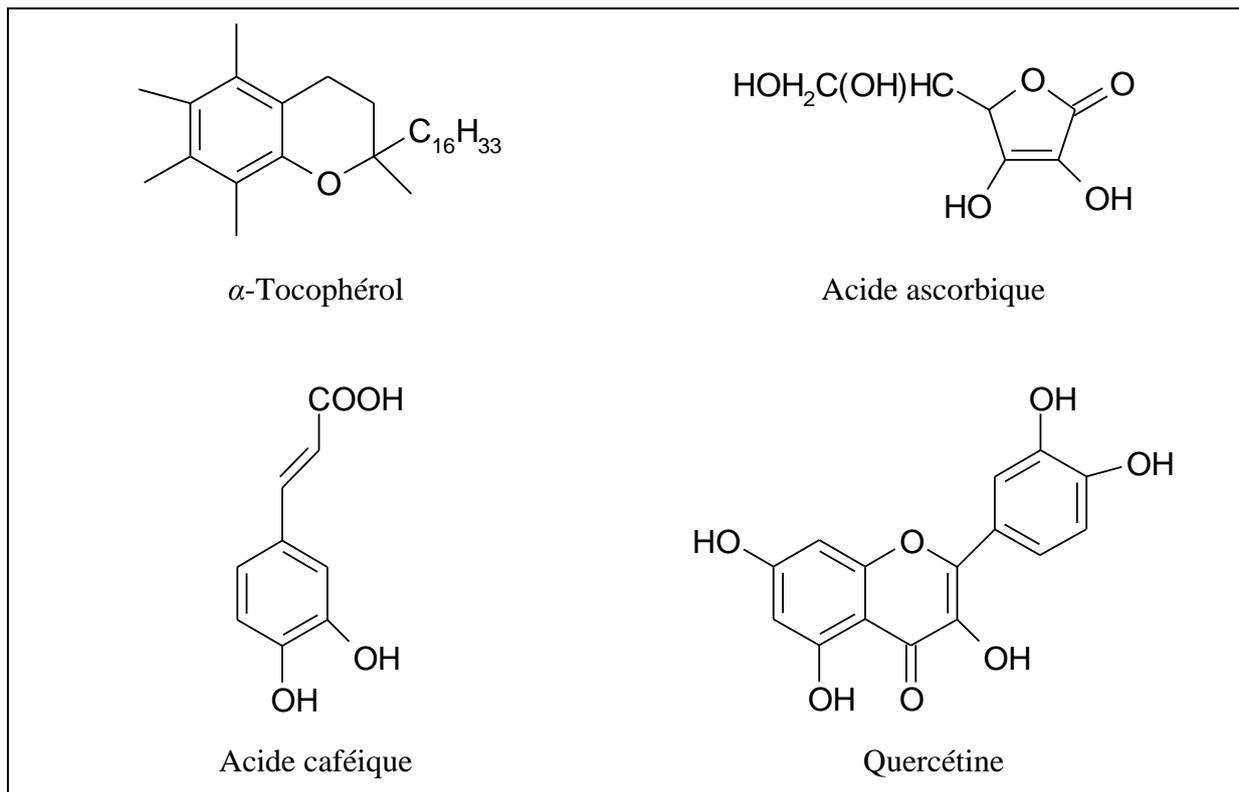


Fig.06 : Structures chimiques de quelques oxydants d'origine alimentaires
 α-Tocophérol (Vitamine E) ; Acide ascorbique (Vitamine C) ; Acide caféique ; Quercétine (Famille des polyphénols)

I.4.4 Pouvoir antioxydant des huiles essentielles

L'examen de la composition chimique d'une huile essentielle permet de prédire grossièrement son potentiel antioxydant. On peut s'attendre à un bon comportement antioxydant des huiles essentielles comportant une teneur élevée en composés phénoliques et en composants terpéniques insaturés de type cyclohexadiène (exemple : γ -terpinène). D'autre part, une faible activité jusqu'à nulle a été observée pour les huiles essentielles comportant peu (ou pas) de composés phénoliques ou de leurs analogues « cyclohexadiène » quand ces huiles essentielles sont mélangées avec des graisses alimentaires [75].

Il a été mentionné que l' α -terpinéol (alcool monoterpénique) est capable de supprimer la production des radicaux superoxydes. L'action antioxydante de l' α -terpinéol reflète sa capacité d'agir en tant qu'agent de conservation dans les produits alimentaires, cosmétiques et dans les produits pharmaceutiques en empêchant l'oxydation dégénérative de leurs composants"[76].

Les huiles essentielles de *Thymus spathulifolius* et d'*Origanum vulgare* L. ssp *hirtum* ont montré une bonne activité antioxydante similaire à celle de l'antioxydant synthétique « BHT ». Ce résultat est attribué à la teneur élevée des huiles en composés phénoliques (thymol et carvacrol) [76].

Cependant l'activité antioxydante des huiles essentielles ne peut être attribuée seulement aux composés phénoliques, les cétones, les aldéhydes, les hydrocarbures et les éthers contribuent aussi à des activités antioxydantes de quelques huiles essentielles. Les huiles essentielles de *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* et *Thymus mastichina* ont montré une bonne activité similaire à la vitamine E. Les trois espèces sont caractérisées par un taux élevé en linalool et en 1,8-cinéol avec une absence totale de thymol et de carvacrol [77].

I.4.5 Méthodes de mesure de l'activité antioxydante (Méthodes *in vitro*)

Plusieurs méthodes ont été décrites pour évaluer la capacité antioxydante *in vitro* d'un composé. L'activité antioxydante d'un composé ne peut pas être mesurée quantitativement d'une façon précise avec une seule méthode, compte tenu de la complexité du processus d'oxydation. Pour cela, il faut combiner les résultats de plusieurs tests pour avoir une indication sur l'activité antioxydante de l'échantillon en question : **ORAC** (Oxygen Radical Absorbance Capacity), **FRAP** (Ferric Reducing Antioxidant Power), **CUPRAC** (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), **TRAP** (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), **TBARS** (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), **ABTS** utilisant le cation radical **ABTS+**• (2,2-azinobis-3-éthyl-benzothiazoline-6-sulphonate), la méthode du radical **DPPH**• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ainsi que le test du blanchissement de la β -carotène] [51-52,78].

I.4.5.1 Test DPPH

La méthode a été introduite par Blois (1958) et développée par Brand-Williams et ses collègues (1995). Elle consiste à déterminer par spectrophotométrie le changement de la concentration du radical DPPH● quand il est en réaction avec un antioxydant [79].

Le DPPH● (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable de couleur violette intense. Ce radical présente une bande d'absorption intense vers les 517-528 nm dans une solution de méthanol ou d'éthanol. La couleur du radical change du violet vers le jaune quand il est réduit par un donneur d'hydrogène, formant ainsi l'hydrazine correspondant (Figures 7 et 8) [52].

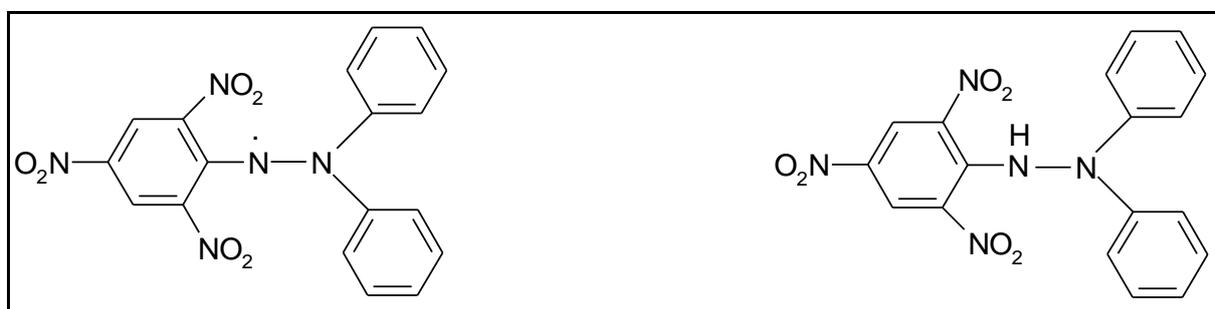


Fig.07 : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

Fig.08 : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine

Foti et ses collaborateurs [80], ont suggéré que la réduction du DPPH suit deux mécanismes: soit par transfert d'hydrogène ou bien par transfert d'électrons. La prédominance de l'un par rapport à l'autre dépend de la nature du solvant et du potentiel redox des espèces présentes. La réaction par transfert d'électrons est rapide dans les solvants polaires tels que le méthanol [80].

La mesure de la diminution de la couleur violette du radical par spectrophotométrie conduit à déterminer l'efficacité de l'antioxydant. Le test DPPH est généralement le plus utilisé en raison de la stabilité du radical DPPH●, de la simplicité et de la reproductibilité de la méthode. Le temps utilisé pour étudier l'activité antioxydante d'un échantillon est relativement court comparé avec d'autres méthodes [81-82].

Evaluer l'activité antioxydante suit 2 approches:

1- Suivre la cinétique de réduction du radical DPPH● par l'antioxydant à différentes concentrations jusqu'à atteindre le plateau (valeur stationnaire de la concentration du radical).

2- Mesure de la concentration initial du radical au début de la réaction puis après un temps d'incubation, qui varie selon les études d'1mn jusqu'à 60 mn. Il a été rapporté aussi un temps d'incubation de 24 h [83].

Les résultats sont toujours portés par rapport à un antioxydant de référence comme la Vit C, le BHT et le Trolox [51,52].

Dans la majorité des études, l'activité est estimée en CE_{50} , ce qui correspond à la concentration de l'antioxydant nécessaire pour la diminution de la concentration initiale du radical DPPH[•] de 50% appelée aussi concentration inhibitrice (CI_{50}). L'évaluer permet de comparer l'activité de plusieurs échantillons : plus la CI_{50} est faible plus la capacité antioxydante du composé est grande.

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre à CE_{50} est appelé T_{CE50} [84]. Suivant ce paramètre, on peut classer le comportement cinétique des antioxydants comme suit : < 5 mn : rapide ; 5-30mn : intermédiaire ; > 30mn : lente [84].

Pour mieux évaluer l'activité anti-radicalaire, un autre paramètre a été introduit nommé « l'Efficacité anti-radicalaire » : $[EAR = 1/CE_{50} T_{CE50}]$ [85].

I.4.5.2 Test FRAP

The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) est une méthode utilisée la première fois pour évaluer la capacité antioxydante du plasma sanguin, puis étendue pour étudier le pouvoir antioxydant (The Ferric Reducing Antioxidant Power) des plantes, des extraits organiques et aqueux, des aliments. C'est une méthode simple, rapide et reproductible [85].

Le pouvoir antioxydant d'un échantillon est déterminé en mesurant par spectrophotométrie à 593 nm le changement de couleur résultant de la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe^{III} -TPTZ) par un antioxydant en tripyridyltriazine ferreux (Fe^{II} -TPTZ) de couleur bleue intense. La réaction se fait à un pH faible à 37°C (Figure 09) [85].

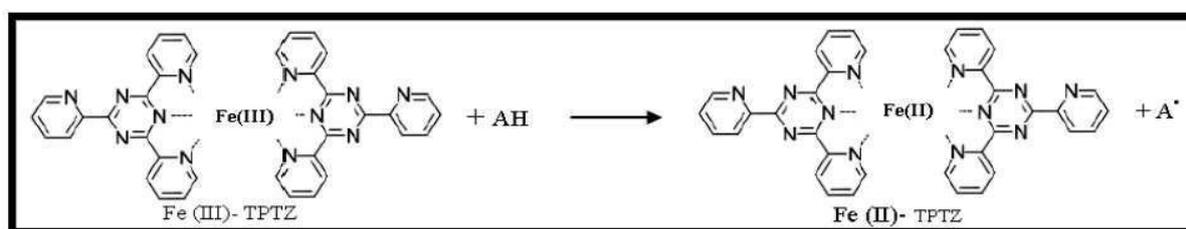


Fig. 09 : Réduction du (Fe^{III} -TPTZ) en (Fe^{II} -TPTZ)

L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait dans les conditions de réaction [82,86]. Pour évaluer le potentiel antioxydant d'un

extrait, le changement de couleur peut être comparé à celui d'un antioxydant standard comme la vitamine C. Néanmoins, le test a montré des inconvénients dont la non capacité de quelques antioxydants biologiques comme le GSH (Glutathion) à réduire le Fe (III) [87].

I.4.5.3 Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique (Test de blanchissement du β -carotène)

La peroxydation lipidique est un processus en chaîne complexe impliquant une variété de radicaux. L'oxydation des lipides conduit au rancissement des aliments, affecte la qualité des produits agroalimentaires et cosmétiques et peut avoir même des effets néfastes sur la santé humaine. Parmi les méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante, le test du blanchissement du β -carotène semble intéressant. La méthode est largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes, des fruits et légumes et des aliments [88].

C'est une technique spectrophotométrique développée par Marco puis modifiée par Miller. Elle consiste à mesurer à 470 nm la décoloration du β -carotène. Cette décoloration est suite à l'oxydation du β -carotène par les produits de dégradation de l'acide linoléique [89-90].

La présence d'un antioxydant pourra retarder la cinétique de blanchissement du β -carotène. La méthode est sensible, simple et relativement rapide (2 heures environ) mais il reste que l'interprétation des résultats n'est pas facile car le β -carotène est lui-même un antioxydant sensible à l'oxygène [91].

I.5 Activité antimicrobienne

I.5.1 Introduction

Les antibiotiques restent le moyen le plus utilisé pour lutter contre les maladies infectieuses. Cependant l'utilisation abusive et excessive des antibiotiques conduit à une résistance devenue un problème de santé publique très préoccupant. En l'absence de réelles stratégies de recherches de nouveaux antibiotiques, nous pousses à trouver (ou à adopter) de nouvelles alternatives afin d'acquérir ces derniers. Ceci poussa plusieurs chercheurs à étudier les plantes à vertus médicinales pour en extraire les principes actifs.

I.5.2. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues à partir des plantes aromatiques pourraient remplacer ou renforcer les antibiotiques. En effet, plusieurs études ont confirmé l'action inhibitrice des huiles essentielles contre des bactéries à Gram-positifs et à Gram-négatifs. L'activité biologique d'une huile suit sa composition chimique : les huiles essentielles riches en phénols (carvacrol, thymol et eugénol), en alcools (linalool), en aldéhydes (cinnamaldéhyde) présentent une bonne activité

antimicrobienne [92]. Les phénols ont montré une plus grande efficacité antibactérienne, virale et parasitaire, ils entraînent des lésions irréversibles sur les membranes [93].

I.5.3 Tests de sensibilité antimicrobienne « *in-vitro* »

Plusieurs travaux durant les 20 dernières années ont permis d'énumérer des techniques de référence afin de déterminer la sensibilité des champignons aux antifongiques ainsi que celle des bactéries vis-à-vis des molécules d'antibiotiques [94].

I.5.3.1 Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes)

En microbiologie, la méthode de diffusion sur milieu solide (antibiogramme et antifongigramme) en utilisant les disques est très utilisée. Elle consiste à ensemencer en surface d'un milieu solide, la souche à tester en utilisant la technique d'écouvillonnage puis à déposer des disques stériles de papier filtre contenant le produit à tester (à une concentration déterminée). Il s'établit un gradient de concentration qui varie avec le temps. La boîte ainsi préparée est mise à incuber pour une période qui varie entre 18h et 24h à 37°C. Il est possible de voir la croissance bactérienne (au milieu de la boîte) ainsi que des zones d'inhibition de la croissance circulaire à proximité de chaque disque. Plus la zone d'inhibition est grande, plus la souche est sensible. Des disques (témoins négatifs) et des disques de comparaison (antibiotiques, antifongiques) sont inclus dans les essais [95].

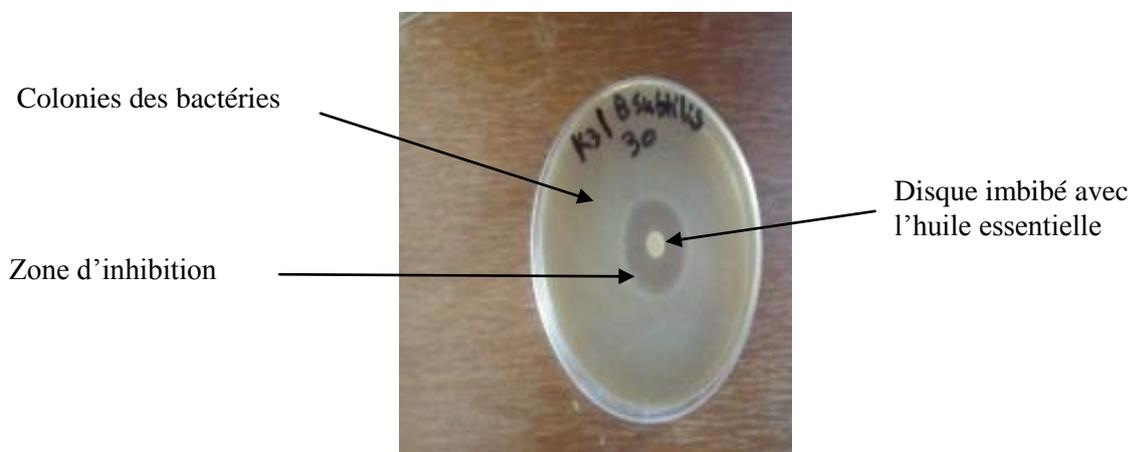


Fig.10 : Aromatogramme (Schéma simplifié)
(Source : Bechlaghem Karima)

I.5.3.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Au laboratoire, on différencie plusieurs techniques: celles en milieu liquide (en tubes ou en microplaque) et en milieu solide gélosé.

- **Méthodes en milieu liquide**

A la différence de la méthode de diffusion sur disques, la méthode de dilution permet de tester les produits directement mélangés avec le milieu de culture.

C'est une méthode quantitative qui nous permet d'évaluer dans le cas où il y a présence d'une activité (détectée par la méthode précédente) le seuil minimum de cette activité appelée la concentration minimale inhibitrice ou CMI.

- **Méthode des Microplaques à 96 puits**

Des microplaques (plaques de microtitration) sont utilisées pour la détermination de la CMI. La plaque à 96 puits permet de déterminer la CMI de 8 composés vis-à-vis une même souche. Dans les cupules d'une même ligne, les dilutions des composés sont introduites à l'aide d'une micropipette. L'incubation se fait pour 24h à la température de 37°C. La CMI correspond à la concentration de la cupule ne présentant pas de croissance [96].

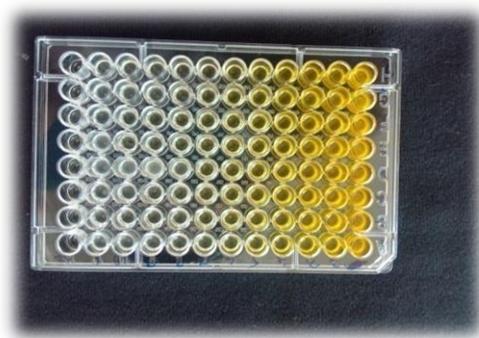


Fig.11 : Plaque de microtitration

(Source : Bechlaghem karima)

- **Méthode des dilutions sur milieu solide**

Une série de dilution des produits à tester sera réalisée. Ensuite, 1ml de chaque dilution sera déversé dans une boîte de pétri à laquelle on ajoute 19 ml d'une gélose maintenue à 45°C. L'ensemble va être mélangé et solidifié devant une source de chaleur. L'ensemencement se fait par spot à partir d'un inoculum dilué au 1/10 du standard 0,5 Mc Farland. La boîte doit être séchée devant un bec bunsen. L'incubation dure pendant 18-24 h à 37° C.

A travers cette méthode plusieurs souches microbiennes peuvent être testées en même temps vis-à-vis d'une même concentration. La lecture se fait à l'œil nu et la CMI est alors

jugée comme étant la plus faible concentration à laquelle aucune croissance visuelle n'est décelée [97].

I.6 Activité enzymatique: Inhibition de l' α - amylase

I.6.1 Introduction

Actuellement le diabète sucré reste l'un des principales causes de mortalité dans le monde. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), le diabète sera en 2030 la 7^{ème} cause de décès dans le monde [98].

En Algérie, le diabète est classé 2^{ème} maladie chronique après l'hypertension. En 2010, 10% de la population ont été identifié comme diabétiques. Le diabète type 2 (non insulino-dépendant) est la forme la plus fréquente du diabète. Une étude réalisée dans la région de Tlemcen (ouest algérien) a montré que la prévalence du diabète est de 15,3% en milieu urbain et 12,9% en milieu rural, 56,7% des diabétiques sont obèses [99].

I.6.2 Traitement du diabète

- **Les antidiabétiques oraux (ADO)** [100]

Les classes de médicaments composant les ADO sont :

- Les biguanides qui favorisent l'action de l'insuline en diminuant la production de glucose dans le foie ;
- Les sulfamides hypoglycémiantes (appelés sulfonylurées) et les glinides (également appelés méglitinides), qui stimulent la production d'insuline ;
- Les glitazones (également appelés thiazolidinediones) qui réduisent la résistance à l'insuline;
- Les inhibiteurs des α -glucosidases qui freinent l'absorption du glucose par l'intestin.

Les biguanides et les sulfamidés hypoglycémiantes sont utilisés depuis longtemps dans le traitement du diabète de type 2.

I.6.3 α -amylase : Mécanisme d'action, Inhibition

L' α -amylase salivaire et pancréatique catalyse l'hydrolyse des liaisons α -(1 \rightarrow 4)-D-glycosidiques des polysaccharides (amidon et glycogène).

L'amidon est un mélange de deux polysaccharides : l'amylose et l'amylopectine qui sont attaqués de manière différente par l'enzyme. Les α -glucosidases situées sur la membrane de bordure en brosse des cellules intestinales, hydrolysent les oligosaccharides résultants en glucose. Cette dégradation permet l'absorption du glucose et fait augmenter la glycémie (Figure 13) [101,102].

Les inhibiteurs de l' α -amylase et les α -glucosidases empêchent la dégradation de l'amidon et des disaccharides en monosaccharides, agissant comme inhibiteurs compétitifs à diverses enzymes [103].

L'acarbose (Figure 13) et le miglitol, deux inhibiteurs des α -glucosidases ralentissent l'absorption intestinale des hydrates de carbone, ainsi la tolérance du glucose des personnes diabétiques sera améliorée [104]. Cependant, ces inhibiteurs provoquent des troubles intestinaux accompagnés de troubles digestives (diarrhées, flatulences). La recherche d'autres inhibiteurs à partir des plantes reste nécessaire en raison de leur faible coût et aux faibles effets secondaires gastro-intestinaux [105].

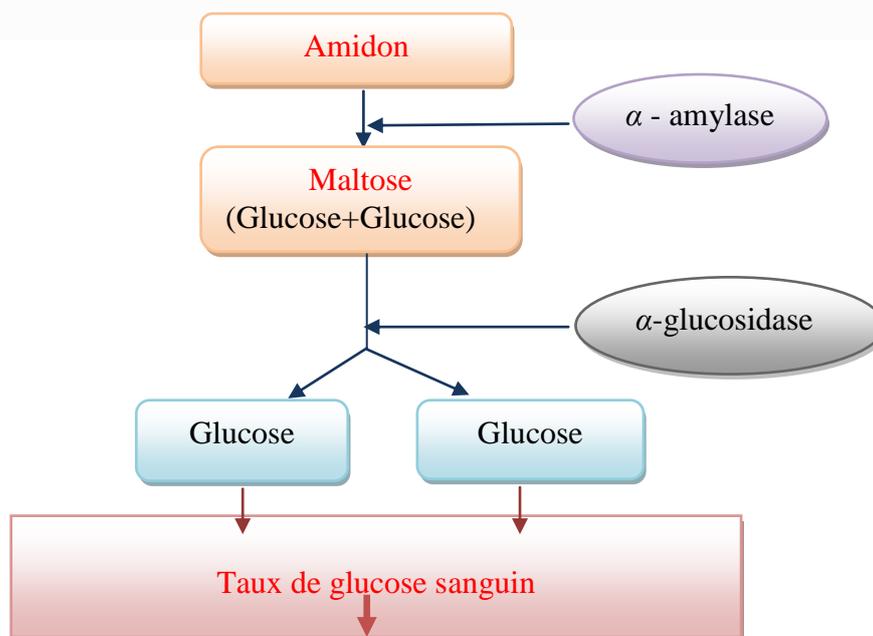


Fig. 12 : Hydrolyse de l'amidon catalysé par l' α -amylase
(Source : Yang et collaborateurs, [102])

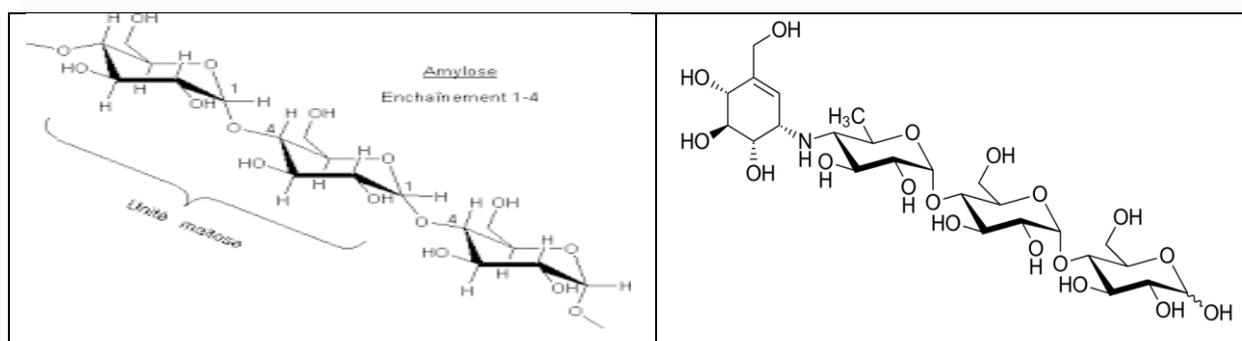


Fig 13 : Enchaînement 1-4 dans les liaisons glycosidiques de l'amylose (à gauche) ; Acarbose (à droite)

I.6.4 Effet antidiabétique des plantes médicinales : mode d'action, principes actifs à effet hypoglycémiant

Les antidiabétiques oraux causent généralement des effets secondaires ce qui complique le traitement du patient diabétique. Le développement de nouveaux médicaments à moindre coût, a incité beaucoup de chercheurs à trouver d'autres sources de molécules bioactives dans le règne végétal.

Plus de 800 plantes dans le monde à potentiel hypoglycémiant ont été reconnues [106], avec plus de 200 composés purs à activités antidiabétiques [107] appartenant à différentes espèces de plantes. Celles qui sont considérées comme hypoglycémiantes puissantes sont regroupées dans les familles suivantes: *Leguminosae* (11 espèces), *Lamiaceae* (8 espèces), *Liliaceae* (8 espèces), *Cucurbitaceae* (7 espèces), *Asteraceae* (6 espèces), *Moraceae* (6 espèces), *Rosaceae* (6 espèces), *Euphorbiaceae* (5 espèces) et *Araliaceae* (5 espèces) [108].

En Algérie, les plantes médicinales sont fréquemment utilisées pour le traitement du diabète. L'enquête ethnobotanique menée dans l'ouest de l'Algérie par (Allali et collaborateurs) [109], a recensé 58 plantes médicinales à effet antidiabétique, les plus utilisées étant : *Trigonella foenum graecum* (*Leguminosae*), *Citrullus colocynthis* (*Cucurbitaceae*), *Saccocalyx satureioides* (*Labiatae*), *Berberis vulgaris* (*Berberidaceae*), *Aloe vera* (*Liliaceae*) et *Globularia alypum* (*Globulariaceae*).

Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés impliquant les effets antidiabétiques des extraits de plantes qui ont montré une action inhibitrice de la réabsorption rénale du glucose, une stimulation de la sécrétion d'insuline à partir des cellules bêta, ou/et inhibition du processus de dégradation de l'insuline et une réduction de la résistance à l'insuline. Autres mécanismes impliquant une action protectrice ou /et régénératrice des cellules pancréatiques bêta, une inhibition de la β -galactosidase, l' α -glucosidase et de l' α -amylase [106,108].

De nombreuses investigations ont été menées sur différentes espèces de plantes dans le but d'identifier de nouveaux agents hypoglycémiant. Les constituants chimiques identifiés dans les familles suivantes ont montré un effet hypoglycémique intéressant, citons : les mucilages, les glycanes, les protéines, les pectines, les flavonoïdes, les stéroïdes, les triterpénoïdes et les alcaloïdes [110-111].

Chez les huiles essentielles, Le camphène a été identifié comme inhibiteur de l' α -amylase. L'acide rosmarinique et d'autres composés phénoliques tels que le carvacrol ont montré une forte inhibition de la dégradation de l'amidon par l' α -amylase pancréatique et salivaire.

L'hydrocarbure terpénique *d*-limonène a été reconnu pour avoir un effet antidiabétique [112-113].

I.6.5 Evaluation de l'activité inhibitrice de l' α -amylase

Le test d'inhibition de l'activité enzymatique est effectué par un dosage colorimétrique des sucres réducteurs (oligosaccharides, dextrines, maltose et glucose) issus de la dégradation de l'amidon par l' α -amylase [114].

En milieu alcalin et chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique réagit avec les oses réducteurs pour former l'acide 3- amino-5-nitrosalicylique qui absorbe fortement la lumière visible à 540 nm. La couleur de la solution vire du rouge orangé au rouge. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des sucres réducteurs présents dans le milieu réactionnel. En présence d'un inhibiteur de l' α amylase, l'absorbance diminue [115].

I.7 Activité insecticide

I.7.1 Introduction

L'alimentation humaine est fournie principalement par l'agriculture, la situation alimentaire des pays en voie de développement (surtout dans les pays de l'Afrique subsaharienne) montre que ces populations souffrent de malnutrition et spécifiquement de carences protéiques. La culture des légumineuses s'est révélée une des meilleures solutions, les légumineuses sont une source de protéines la moins coûteuse [116].

Les légumineuses ou Fabacées sont des plantes dicotylédones cultivées pour leurs graines qui représentent une part importante de l'alimentation humaine et animale.

Du point de vue nutritionnel, les légumineuses sont très importantes. Les graines des légumineuses contiennent entre 20 et 25% de protéines (2 à 3 fois plus que les céréales) et renferment 24 acides aminés indispensables à l'alimentation. Les légumineuses sont aussi riches en divers minéraux comme le potassium, le calcium et le fer. Elles sont source de vitamines du groupe B. D'autre part, ces cultures sont les plus respectueuses de l'environnement parce qu'elles assurent leur propre approvisionnement en azote (grâce à l'activité de bactéries symbiotiques, les *Rhizobium*) contribuant ainsi à maintenir la fertilité des sols, réduisant les coûts de production et limitant d'autre part la pollution des nappes phréatiques par les nitrates des engrais [117-119].

Les principales légumineuses sèches utilisées sont, par ordre d'importance, les haricots secs, les pois secs, les pois chiches, les lentilles, les doliques, les pois d'Angole et les fèves.

Ces cultures sont soumises à plusieurs contraintes qui agissent sur la qualité et la quantité des produits attendus. Les performances agronomiques de la plante cultivée ont été améliorées

dans un environnement édaphique et climatique contrôlée mais l'agriculteur doit toujours composer avec d'autres agents biologiques comme les insectes qui peuvent causer tant de pertes dans les champs ou en stock [119]

I.7.2 Situation actuelle en Algérie

La culture des légumineuses en Algérie subit plusieurs contraintes qui peuvent affecter la production de ces cultures. Les aléas climatiques et les ravageurs constituent un sérieux problème au cours du stockage des grains après la récolte. Les graines sont généralement attaquées par les coléoptères *Bruchinae* dont les larves ne consomment et ne se développent que dans les graines mûres des légumineuses [120].

La production nationale est marquée par un déficit de ces produits qui dominent la base de la consommation algérienne. Le taux de production est d'une moyenne de 67.990 tonnes impliquant une couverture d'une moyenne de 27% (pour la période de 2008-2012), par conséquent le recours aux importations est nécessaire malgré les efforts indéniables réalisés. La moyenne des importations est de 182.145 tonnes pour la même période [121].

I.7.3 Production mondiale du pois chiche

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est la troisième légumineuse à grains la plus cultivée au monde après les haricots et le soja. Elle est considérée comme une source agronomique importante de protéines (19,3-25,4%) [122].

La production du pois chiche a augmenté durant les dernières décennies dans le monde, elle a atteint 09 millions de tonnes après le haricot sec (19 millions de tonnes) [123].

Le principal producteur de pois chiches est l'Asie du Sud avec 71% de la production mondiale. En 2013, l'Inde a dominé la production mondiale avec 67%, soit 10 fois plus que l'Australie qui est classée 2^{ème} mondialement. Les autres principaux producteurs de pois chiches au monde sont le Pakistan, la Turquie, le Mexique et le Canada [124].

I.7.4 Production nationale du pois chiche

En Algérie, le pois chiche est un élément très présent dans la cuisine algérienne. Il occupe une place importante dans le domaine agricole. En surface cultivée, cette espèce occupe la deuxième place après la fève et la féverole [125].

La culture du pois chiche a failli disparaître dans les années 70 car sa culture traditionnelle était épuisante mais la mécanisation a pu sauver cette culture [126].

La production annuelle des pois chiches sont de 45.000 tonnes, ce déficit en matière de consommation rend les importations de pois chiche importantes malgré les aides fournies par l'état aux agriculteurs. Les importations sont estimées à plus de 150.000 tonnes par an, soit

200 millions de dollars. Les pays fournisseurs de l'Algérie sont le Vietnam, l'Espagne, et la Thaïlande avec des parts de marché de 49,27 et 16,4% respectivement.

Avec plus de 57.575 quintaux de pois chiches durant la saison agricole 2010-2011, la wilaya d'Aïn Témouchent s'illustre parmi les wilayas qui ont réalisé les meilleures performances dans ce domaine. La wilaya devrait permettre la couverture de 25% des besoins du pays en cette matière, souligna la direction des services agricoles. Le suivi des itinéraires techniques, l'utilisation de labours profonds, d'engrais adéquats et l'irrigation d'appoint sont des facteurs qui ont contribué à cette performance [126].

I.7.5 Maladies et ravageurs des stocks de légumineuses

Parmi les facteurs de diminution de la production des légumineuses dans le monde, on trouve les maladies virales et fongiques ainsi que les insectes ravageurs.

Au niveau mondial, la principale maladie du pois chiche est l'ascochytose qui est provoquée par *Ascochyta rabiei* (Pass.)Labr., (agent pathogène fongique du pois chiche). En Algérie ainsi que dans les pays du Maghreb, la maladie la plus rencontrée dans les cultures des pois chiches est l'anthracnose qui cause le plus de dégâts, la diminution en rendement peut atteindre jusqu'à 100% [123].

Les bruches (*Coleoptera : Bruchidae*) sont les plus importants insectes ravageurs des légumineuses à grains notamment dans les pays chauds. Ces insectes envahissent les graines au champ et se multiplient pendant l'entreposage [127].

Les *Bruchidae* comprennent deux groupes, le premier renferme des bruches qui se développent dans les graines encore vertes (bruches des champs) ayant une seule génération annuelle (espèces univoltines), et le deuxième groupe englobe des bruches qui se développent dans les graines sèches (dans les entrepôts) qui ont plusieurs générations annuelles (espèces polyvoltines). C'est le cas de *Callosobruchus maculatus* (bruche du pois chiche) [120] (Figure 14).

Les pertes aux denrées stockées par ces bruches sont très importantes. *C. maculatus*, (un des insectes les plus nuisibles des légumineuses stockées) peut causer la perte totale d'un stock, 800g/Kg de perte sont estimés après 7 mois de stockage [127-128].

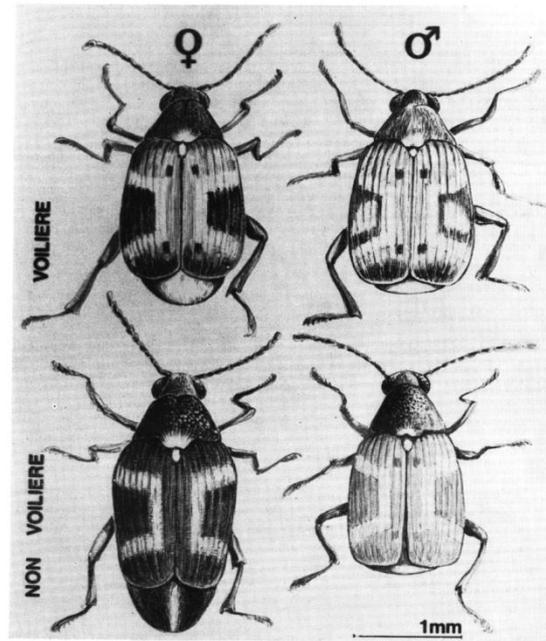


Fig. 14 :

A gauche : Infestation du pois chiche par *C. maculatus*

(Source : Bechlaghem karima)

A droite : Deux formes distinctes de *C. maculatus* identifiés dans la nature (Voilière, fréquente dans les champs ; non voilière plus fréquente dans les greniers)

(Source : Viaud, P., [129])

- **Position systématique** [130]

La position systématique du bruche de pois chiche est comme suit :

Règne : Animal

Embranchement : Arthropodes

Classe : Insectes **Ordre :** Coléoptères

Sous ordre : Hétérogastra

Famille : Bruchidae

Sous famille : Bruchinae

Genre : *Callosobruchus*

Espèce : *Callosobruchus maculatus* (Fabricius)



Les femelles pondent leurs œufs sur les graines ou les gousses et les larves néonates pénètrent dans les graines immatures. Les larves détruisent l'enveloppe interne des graines pour y faire leur loge de nymphose [127].

I.7.6 Moyens de lutte

Pour améliorer l'efficacité de la gestion des insectes ravageurs des cultures et des denrées stockées, la recherche a développé plusieurs formes de lutte (lutte chimique, lutte biologique, résistance variétale), cependant leur appropriation reste limitée.

Les pesticides de synthèse ont montré une efficacité à contrôler les insectes nuisibles, néanmoins de nombreux griefs leur sont attribués. Parmi lesquels on trouve l'accoutumance des insectes, la pollution de l'environnement, les désordres écologiques et les intoxications [131].

I.7.6.1 Insecticides de contact [116]

- **Composés organochlorés**

Le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et le lindane (hexachlorocyclohexane) sont très actifs contre *C.maculatus*, leur DL₅₀ (dose létale pour 50% de la population d'insectes) est 0,022 et 0,01 µg/ adulte respectivement. Ces deux pesticides sont très toxiques pour l'homme.

- **Composés organophosphorés**

Parmi les produits polyvalents utilisés contre les insectes des denrées on trouve :

Le malathion, le primiphos méthyle, le chlorpyriphos méthyle, le dichlorvos. Le primiphos méthyle apparait le plus efficace contre la bruche du niébé.

- **Carbamates**

Le carbaryl est le plus utilisée, sa DL₅₀ est de 0,25 µg/ adulte de *C.maculatus*.

- **Pyréthriinoïdes de synthèse**

La perméthrine, la cyfluthrine et la deltaméthrine sont des produits à longue persistance d'action avec une toxicité faible pour l'homme.

I.7.6.2 Fumigants

La phosphine est très utilisée dans les pays chaud, ce pesticide est très actif contre les œufs et les larves de *C.maculatus* [116]. Néanmoins, les recommandations de l'OMS en 2005 et en 2015 sont en faveur de l'élimination des fumigants classiques (bromure de méthyle et phosphore d'hydrogène) considérés nuisibles pour l'homme et l'environnement [132].

La manipulation des molécules toxiques contenues dans les pesticides par les agriculteurs mal informés sur les risques de ces produits chimiques, peut avoir de graves

conséquences. Leur application doit être bien étudiée et la formation des agriculteurs pour une lutte raisonnée doit être aussi développée [119].

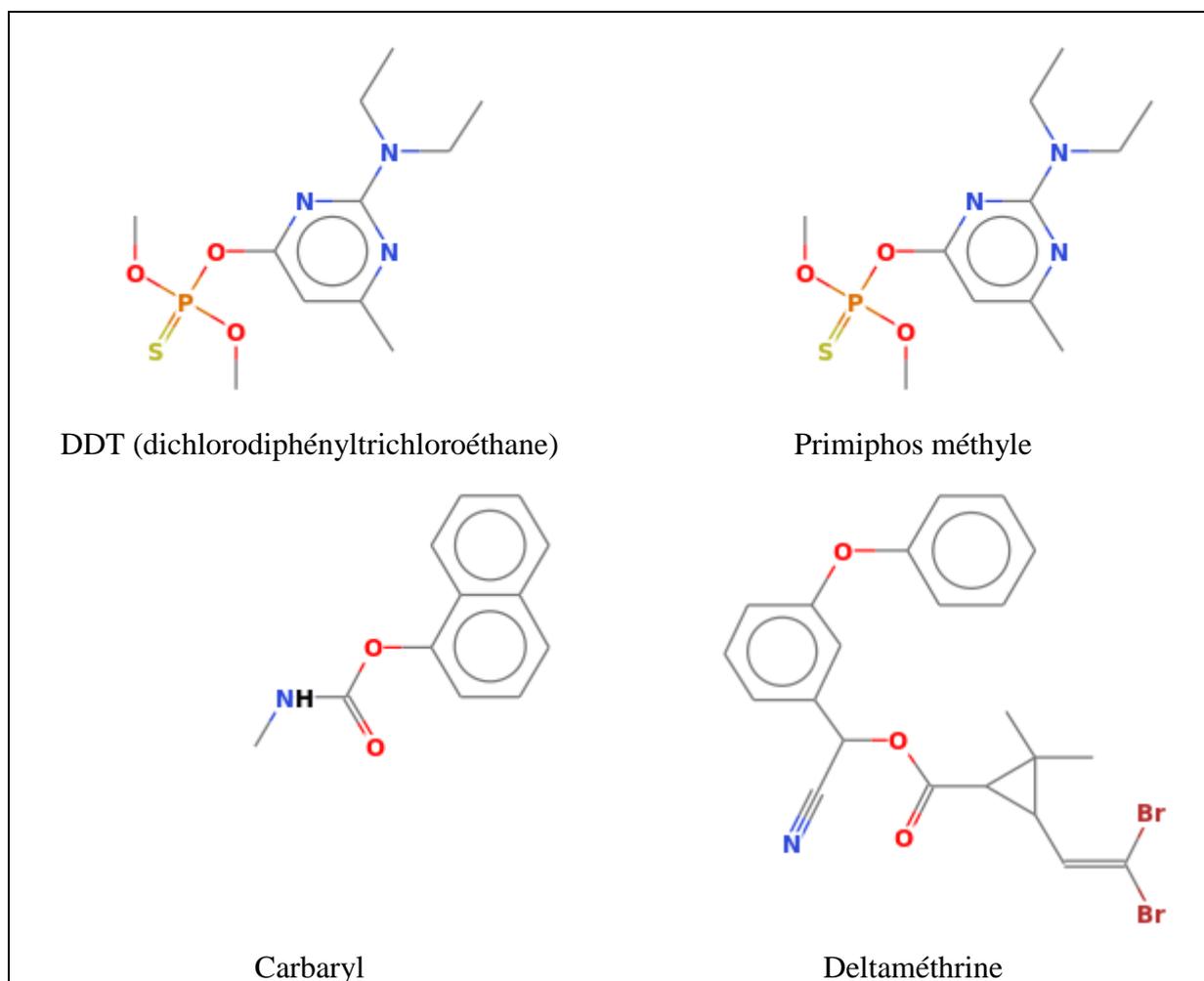


Fig.15 : Structures chimiques de quelques pesticides chimiques

(Source : WebBook de Chimie NIST)

Suite aux conséquences néfastes de l'utilisation des insecticides chimiques, la recherche vers des méthodes alternatives s'avère nécessaire. La recherche s'oriente vers les ressources végétales à effet insecticide. Parmi les dérivés de plantes, les huiles essentielles constituent la formulation adéquate alternative, elles agissent comme des fumigants naturels [132-133].

I.7.7. Utilisation des plantes insecticides : Action des huiles essentielles

Les plantes sont utilisées depuis longtemps pour la protection des récoltes pour leurs effets répulsif, de contact ou fumigant. Avec la diversité des plantes qui existent, les molécules bioactives varient d'une famille à une autre et la sensibilité diffère d'un stade à un autre pour le même insecte [131].

L'application des huiles essentielles pour la protection des denrées au cours du stockage a fait objet d'importants travaux. La toxicité des huiles s'exprime de différentes manières : activité ovicide, larvicide, antinutritionnelle et inhalatoire [132].

La toxicité des huiles essentielles est importante contre les adultes de bruche en absence de graines qu'en présence de graines. La présence de résidus d'huile essentielle sur les graines n'altère pas la germination des graines traitées mais elle peut affecter la qualité nutritionnelle de ces graines [134-135].

L'étude de Kim et collaborateurs [136], montre que l'activité des huiles essentielles varie selon la plante, l'espèce de l'insecte et le temps d'exposition.

Les mécanismes d'action des huiles essentielles sur les ravageurs ne sont pas très bien connus mais il a été suggéré que les huiles essentielles agissent sur les récepteurs d'octopamine (neurotransmetteur qui a un effet régulateur sur le rythme cardiaque, la motricité, la ventilation, le vol des invertébrés) [128]. D'autres études ont indiqué qu'en situation de stockage, les composés soufrés et terpéniques des huiles essentielles peuvent inciter une mortalité importante des adultes et des œufs à faible dose. Les auteurs ont suggéré que les monoterpènes sont des neurotoxiques qui provoquent l'inhibition de l'acétylcholinestérase, les composés soufrés agissent sur les canaux potassium de la blatte et n'ont pas d'effet cholinergique [132-134]. L'activité insecticide des huiles essentielles dans beaucoup de plantes est due principalement aux monoterpènes. En raison de leur grande volatilité, ils ont une action fumigante importante sur les insectes des denrées stockés. Le carvacrol (un monoterpène oxygéné) est douée d'une grande activité insecticide et acaricide [136].

I.7.8 Evaluation du pouvoir insecticide des extraits de plantes

L'étude de la toxicité des extraits naturels permet de faire apparaître le rôle de ces extraits pour limiter la population des ravageurs. Estimer le taux de mortalité est considéré comme le 1^{er} critère de jugement de l'efficacité d'un traitement chimique ou biologique. Les tests consistent à mesurer la mortalité des insectes après traitement avec des solutions des extraits végétaux suivant des méthodologies [137] puis à déterminer la dose létale pour 50% de la population d'insectes (DL₅₀) [138].

Références Bibliographiques

- [1] Khattali, H., Sghaier, M., Gammoudi, T. (2013). Etude de la filière des plantes aromatiques et médicinales et perspectives de développement dans le sud est tunisien. *Acta Horticulturae*, 997: 305–317.
- [2] El Meskaoui A., Bousta, D., Dahchour, A., Greche, H., Harki, E., Farah, A., Ennabili, A. (2008). Plantes médicinales Et aromatiques marocaines : Opportunités et défis. *Revue AFN Maroc*, N^o : 2-3, 74- 87.
- [3] Neffati M., Sghaier M. (2014). Développement Et valorisation des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au niveau des zones désertiques de La région MENA (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc Et Tunisie : Rapport principal). *Observatoire du Sahara et du Sahel*, Projet MENA-DELP, p: 3.
- [4] Ilbert H., Hoxha V., Sahi, L., Courivaud A., Chailan, C. (2016). Le Marché des plantes aromatiques et médicinales: analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. Options Méditerranéennes, Série B : Etudes et recherches. Montpellier : CIHEAM, p : 27-30, 119.
- [5] Bessah , R., Benyoussef , E. (2015). La filière des huiles essentielles, état de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables*, 18(3): 513-528.
- [6] Hammich, V., Gheyouché, R. (1988). Plantes médicinales et thérapeutiques, 1^{ère} partie: Les plantes médicinales dans la vie moderne et leur situation en Algérie. *Annale de l'Institut National Agronomique* (El- Harrach), 12(1), T.2, p: 419-449.
- [7] Silvant, C. (2015). L'aromathérapie : la nature au service de l'humanité. Paris: Publibook, p : 11.
- [8] Couic-Marinier, F., Lobstein, A. (2013). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités Pharmaceutiques*, 52 (525): 18-33.
- [9] Lardry, J.M., Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la Revue*, 61, 14-17.
- [10] Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F. (2012). La connaissance des huiles essentielles : Qualtologie et aromathérapie. Paris: Springer-Verlag, P: 2-15.
- [11] Chiasson, H., Beloin, N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides: Nouveau genre. *Antennae -Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec*, 14(1) : 3-6.
- [12] Lubbe, A., Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34: 785-801.

- [13] Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidant, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621–632.
- [14] Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19: 156-164.
- [15] Farag, R.S., Mahmoud, E.A., Basuny, A.M., Ali, F.M.R. (2006). Influence of crude olive leaf juice on rat liver and kidney functions. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 790–798.
- [16] Olmedo, R. H., Nepote, V., Grosso, N.R. (2012). Aguaribay and cedron essential oils as natural antioxidants in oil-roasted and salted peanuts. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 89: 2195–2205.
- [17] Pibiri, M.C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat en sciences, Ecole polytechnique fédéral de Lausanne.
- [18] Benini, C., Danflous, J.P., Wathélet, J.P., Du Jardin, P., Fauconnier, M.L. (2010). L'ylang-ylang [*Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson] : une plante à huile essentielle méconnue dans une filière en danger. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(4): 693-705.
- [19] Bachiri, L., Bammou, M., Echchegadda, G., Ibijbijen, J., El Rhaffari, L., Haloui, Z., Nassiri, L. (2017). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux espèces de Lavande : *Lavandula Dentata Spp. Dentata* et *Lavandula Pedunculata Spp. Pedunculata*. *European Scientific Journal* : 293-311.
- [20] Khribch, J., Nassik, S., El Houadfi, M., Zrira, S., Oukessou, M. (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Revue Marocaine des Sciences agronomiques et vétérinaires*, 6(3): 300-307.
- [21] Alaoui-Jamali, C., Kasrati, A., Leach, D., Abbad A. (2016). Etude comparative de l'activité insecticide des huiles essentielles des espèces de thym originaires du sud-ouest marocain. *Phytothérapie*. Doi : 10.1007/s10298-016-1051-6.
- [22] Bouchikhi-Tani, Z., Khelil, M.A. Bendahou, M. (2018). Evaluation des propriétés larvicides des huiles essentielles extraites de cinq plantes aromatiques d'Algérie: essai sur la mite *Tineola Bisselliella* (Lepidoptera: Tineidae). *Lebanese Science Journal*, 19 (2) : 187-199.
- [23] Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N. (2018). Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*. 16 (5): 254-26.

- [24] Ismaili, R., Houbairi, S. (2017). Etude De L'activité antioxydante des huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales Marocaines. *European Scientific Journal*, 13: 1857- 7431.
- [25] Cannas, S., Usai, D., Pinna, A., Benvenuti, Tardugno, S.A., Donadu, M., Zanetti, S., Kaliyamurthy, J., Molicotti, P. (2015). Essential oils in ocular pathology: an experimental study. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(6): 650-654.
- [26] Bel Hadj Salah-Fatnassi, K., Slim-Bannour, A., Harzallah-Skhiri, F., Mahjoub, M.A., Mighri, Z., Chaumont, J. P., Aouni, M. (2010). Activités antivirale et antioxydante in vitro d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica*, 157 (3): 433-444.
- [27] Bourkhiss M., Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A., Satrani B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (vahl) masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 79 : 141-154.
- [28] Bakkali Aissaoui, A., El Amrani, A. (2018). Activité acaricide des huiles essentielles du *Mentha Pulegium*, *Origanum compactum* et *Thymus capitatus* sur L'acarien phytophage *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae). *European Scientific Journal*, 14(3): 1857 - 7881.
- [29] Haddouchi, F., Benmansour, A. (2008). Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire*, 3(8) : 20-27.
- [30] Golmakani, M.T., Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109: 925-930.
- [31] Bardeau, F.(2009). Les huiles essentielles, découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Paris: Lanore, p.17, 21.
- [32] Thi, N.D.T., Anh, T.H., Thach, L.N. (2008). The essential oil composition of *Eryngium foetidum* L. in south vietnam extracted by hydrodistillation under conventional heating and microwave irradiation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(2): 154–161.
- [33] Clevenger, J. F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association*, 17(4): 345–349.
- [34] Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T., Rachiq, S. (2015). Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse. *Journal of Materials of Environmental Science*, 6(8): 2346-2357.
- [35] Elyemni, M., Bouchra, L., Imane Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M., Eloutassi, N. (2019). Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two

different methods: hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. *Scientific World Journal*, 2019: 1-6.

[36] Nitthiyah, J., Hamid Nour, A., Kantasamy, R., Akindoyo, J. O. (2017). Microwave assisted hydrodistillation an overview of mechanism and heating properties. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(3): 22-29.

[37] Crabas, N., Marongiu, B., Piras, A., Pivetta, T., Porcedda, S. (2003). Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton by supercritical CO₂. *Journal of Essential Oil Research*, 15: 272-277.

[38] Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L., (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3:12.

[39] Guedes de Pinho, P., Pereira, D.M., Gonçalves, R.F., Valentão, P., Fernandes, F., Taveira, M., Andrade, P.B. (2009). Headspace - Solid Phase MicroExtraction and Gas Chromatography Mass Spectrometry applied to determination of volatiles in natural matrices. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 1-15.

[40] Heath, J.J., Cipollini, D.F., Stireman, J.O. (2013). The role of carotenoids and their derivatives in mediating interactions between insects and their environment. *Arthropod-Plant Interactions*, 7: 1-20.

[41] Akemi Ohmiya, A. (2009). Carotenoid cleavage dioxygenases and their apocarotenoid products in plants. *Plant Biotechnology*, 26: 351-358.

[42] Arscott, S.A., Tanumihardjo, S.A. (2010). Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 223-239.

[43] Ducauze, C. (2014). Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie : Concepts, démarche et méthodes. Paris : Lavoisier, Tec et Doc, p: 119.

[44] Lucaccioni, F., Denayer, R., Tilquin, B. (1993). Pour une analyse des huiles essentielles. *Chimie Nouvelle*, 11(43): 1253-1257.

[45] Mariott, P. j., Shellie, R., Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, 936 : 1-22.

[46] Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris: Tec et Doc, 4^{ème} édition, p: 587, 588.

[47] Mouhssen, L., Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils (2004). *Phytotherapy Research*, 18 : 435-448.

- [48] Bouchonnet, S. (2009). La spectroscopie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Paris : Lavoisier, Technique et Documentation, P : 22-24, 172-174.
- [49] Fay, L.B. (1998). Application du couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse en tandem (CPG/SM/SM) à l'analyse de produits alimentaires, *Analisis Magazine*, 26(01) : M28-M32.
- [50] Bradesi, P., Bighelli, A., Tomi, F., Casanova, J. (1996). L'analyse des mélanges complexes par RMN de carbone -13- partie 2. *Canadian Journal of Applied Spectroscopy*, 41 (2): 41-50.
- [51] Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4: 25-39.
- [52] Pyrzynska, K., Pekal, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *The royal society of chemistry, Analytical Methods*, 5: 4288-4295.
- [53] Thiebault, C. M., Sprumont, P. (1998). L'enfant et le sport : Introduction à un traité de médecine du sport chez l'enfant. Paris : De Boeck Université, p : 141.
- [54] Lang, P.O., Proust, J., Vogel, T., Aspinall, R. (2013). Saurons-nous jamais ce qui provoque le vieillissement ? *Neurologie-Psychiatrie- Gériatrie*, 13: 337-343.
- [55] Tanguy, M., Begué-simon, A.M. (2009). Antioxydants, première partie : les antioxydants dans l'alimentation. *Médecine*, 257-260.
- [56] Gardès-Albert, M., Bonnefont- Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : « Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? », *Actualité Chimique*, 270 : 91-96.
- [57] Alam, M. N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21: 43-152.
- [58] Cheurfa , M., Allem, R. (2015). Study of hypocholesterolemic activity of Algerian Pistacia lentiscus leaves extracts in vivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Doi:10.1016/j.bjp.2015.02.011
- [59] Defraigne, J.O., Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités, *Revue Médicale de Liège*, 63: 10-19.
- [60] Causse, C. (2004). Les secrets de santé des antioxydants: Plus jeune, plus longtemps avec les antioxydants. France, Alpen, p:13.
- [61] Bouayed,J.(2010). Polyphenols: A potential new strategy for the prevention and treatment of new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current Nutrition and Food Science*, 6: 13-18.

- [62] Favier, A. (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 270 :108-115.
- [63] Descheemaeker, K. (2000). Nutri et phytothérapie , développements récents-1. Belgique : Garan, p: 75.
- [64] Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62, 10 : 628-638.
- [65] Arthur, J.R. (2002). The glutathione peroxidases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1825-1835.
- [66] Leger, C.L. (2000). La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardio-vasculaire, biodisponibilité. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 7(3) : 258-265.
- [67] Cuvelier C., Dotreppe O., Istasse L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Annales de Médecine Vétérinaire.*, 147: 315-324.
- [68] Cazeneuve, J.F., Leborgne, J.M., Kermad, K., Hassan, V. (2002). Vitamine C et prévention du syndrome douloureux régional complexe de type 1 après fracture du radius distal traitée chirurgicalement. *Acta Orthopaedica Belgica*, 68 (5):481-484.
- [69] Bouayed, J. (2010). Polyphenols: a potential new strategy for the prevention and treatment of new strategy for the prevention and treatment of anxiety and depression. *Current Nutrition and Food Science*, 6 :13-18.
- [70] Meunier, J. (2014). Photoprotection interne, EMC- Cosmétologie et Dermatologie Esthétique, 9(1) :1-6.
- [71] Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15, (4): 523-530.
- [72] Nicol M., Maudet, M. (2000). Caroténoïdes et vitamine A : « Actualités ». *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*.7 (3): 266-70.
- [73] Butterfield, D.A., Castegna, A., Pocernich, C.B., Drake, J., Scapagnini, G., Calabrese, V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 444–461.
- [74] Guillard, J. C. (2011). Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : Synergie et/ou compétition. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 18,8 : 59-67.
- [75] Amorati, R., Foti, M.C., Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61: 10835–10847.
- [76] Khaleel, C., Tabanca, N., Buchbauer, G. (2018). α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chemistry Journal*, 16: 49-361.

- [77] Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: « A review ». *Phytotherapy Research*, 21, 308-323.
- [78] Antolovich, M., Prenzler, P., D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analysts*, 127:183-198.
- [79] Karagozler, A. A., Erdag, B., Emek, Y. E., Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111:400-407.
- [80] Foti, M. C., Daquino, C., Geraci, C. (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• Radical in alcoholic solutions. *The Journal of Organic Chemistry*, 69: 2309-2314.
- [81] Kholkhal, F., Lazouni, H.A., Bbendahou, M., Boublenza, I., Chabane, S.D., Chaouch, T. (2013). Etude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus* ssp. *Coloratus*. *Afrique science*, 09(1):151- 158.
- [82] Cetin, A., Geçibesler, I., H. (2015). Evaluation as antioxidant agents of 1,2,4-triazole derivatives: effects of essential functional groups. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (6), 120-126.
- [83] Dawidowicz, A.L., Wianowska, D., Olszowy, M. (2012). Practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131: 1037–1043.
- [84] Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2): 270-276.
- [85] Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239 :70–76.
- [86] Zbadi, R., Mohti, H., Moussaoui, F. (2018). Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes Médicinales. *Médecine Thérapeutique*, 24 (2):143-141.
- [87] Griffin, S. P., Bhagooli, R. (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302 (2004): 201-211.
- [88] Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva., L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.
- [89] Marco, G. J. A. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45: 594-598.
- [90] Miller, H. E. (1971). A Simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(2): 91-91.

- [91] Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46 (2007): 244-282.
- [92] Khribch, J., Nassik, S., El Houadfi, M., Zrira, S., Oukessou, M. (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 6(3): 300-307.
- [93] Bel Hadj Salah-Fatnassi, K., Slim-Bannour, A., Harzallah-Skhiri, F., Mahjoub, M.A., Mighri, Z., Chaumont, J.P., Aouni, M. (2010). Activités antivirale et antioxydante *in vitro* d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica*, 157(3) : 433-444.
- [94] Dannaoui, E. (2006). Méthodologie d'évaluation de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques. *Thérapie*, 61(3): 201-207.
- [95] Benkherara, S., Bordjiba, O., Djahra, A. B. (2015). Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*. *Phytothérapie*, 13(1): 14-18.
- [96] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing for bacteria that grow aerobically; Approved Standard M7-A7. Wayne, PA: Seventh Edition, 26 (02).
- [97] Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79
- [98] Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine*, 3(11), e 442.
- [99] Dali-Sahi, M., Benmansour, Aouar, A., et Karam, N. (2012). Etude de l'épidémiologie du diabète de type 2 dans des populations endogames de L'ouest algérien. *Lebanese Science Journal*, 13, (2): 17-26.
- [100] Inzucchi, S.E. (2002). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. *Journal of the American Medical Association*, 287(3): 360-372.
- [101] Sayah, K., Marmouzi, I., Mrabti, H.N. Cherrah, Y., Faouzi, M. (2017). Antioxidant activity and inhibitory potential of *Cistus salvifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *BioMed Research International*. Article ID 2789482, 7 pages.
- [102] Yang, C.Y., Yen, Y.Y., Hung, K.C., Hsu, S.W., Lan, S.J., Lin, H.C. (2019). Inhibitory effects of pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: a systemic review. *Nutrition & Diabetes*, 9(1) : 23.

- [103] Brogard, J.M., Willemin, B., Blicklé, J.F., Lamalle, A.M., Stahl, A. (1989). Inhibiteurs des alpha-glucosidases: une nouvelle approche thérapeutique du diabète et des hypoglycémies fonctionnelles. *La Revue de Médecine Interne*, 10(4): 365–374.
- [104] Goetz, P. (2007). Phytothérapie du diabète. *Phytothérapie*, 5(4): 212- 217.
- [105] Yilmazer-Musa, M., Griffith, A.M., Michels, A. J., Schneider, E., Frei, B. (2012). Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36):8924–8929.
- [106] Jarald, E., Joshi, S.B., Jain, D.H. (2008). Diabetes and herbal medicines. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*. 7(1): 97-106.
- [107] Ali, H., Houghton, P. J., Soumyanath, A. (2006). α -Amylase inhibitory activity of some malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3): 449–455.
- [108] Bnouam, M., Ziyate, A., Mekhfi, H., Tahri, A., Legssyer, A. (2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity : A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 14:1-25.
- [109] Allali, H., Benmehdi, H., Dib, M.A., Tabti, B., Ghalem, S., Benabadji, N. (2008). Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 20 (4): 2701-2710.
- [110] Gbekley, E.H., Agbodeka, K., Simplicite, D.K., Ananai, K., Adjirah, Y., Toudji, G., Ameyapoh, B, A., Simpore, J., Gbeassor, M. (2017). Composés bioactifs isolés des plantes à propriété anti-diabétique: Revue de littérature. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 19(14): 839-849.
- [111] Sudha, P., Smita, S.Z., Shobha, Y.B., Ameeta, R.K. (2011). Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(5): 1-10.
- [112] Béjaoui, A., Boulila, A., Boussaid, M. (2013). Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(32): 2429-2435.
- [113] Joo, H.E., Lee, H.J., Sohn, E.J, Lee, M.H., Ko,H. S., Joeng, S. J., Lee, H.J., Kim, S.H. (2013). Antidiabetic potential of the essential oil of *Pinus koraiensis* leaves toward Streptozotocin-treated mice and HIT-T15 pancreatic β -cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 77(10): 130254-1-5.
- [114] Loizzo, M.R., Saab, A.M., Statti, G.A., Menichini, F. (2007). Short report: composition and α -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. *Fitoterapia*, 78: 323-326.
- [115] Bernfeld, P. (1955). "Amylases, α and β ". *Methods in enzymology*, 1: 149-158.

- [116] Lienard, V., Seck, D. (1994). Revue des méthodes de lutte contre *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), ravageur des graines de niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) en Afrique tropicale. *International Journal of Tropical Insect Science*, 15(03) : 301-311.
- [117] Belabid, L., Fatas, Z., Dalli, D., Khiare, M., Amdjad, D.(2000). Flétrissement et pourriture racinaire de la lentille dans le Nord-Ouest algérien. *Cahiers Agricultures*, 9 : 515-8.
- [118] Cruz, J.F., Hounhouigan, D.J., Havard, M., Ferré, T. (2019). La transformation des grains. *Agricultures tropicales en poche*. Versailles, Paris : Quae, CTA, Presses agronomiques de Gembloux, p: 14, 16.
- [119] Huignard, I., Glitho, A. (2011). Importance agronomique et alimentaire des légumineuses. Biologie des Bruchinae et lutte raisonnée en Afrique. Versailles, Quae, p: 7,16-17.
- [120] Bouchikhi Tani, Z., Khelil, M., A., Bendahou, M., Pujade-Villar, J. (2012). Lutte contre les trois bruches *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831), *Bruchus rufimanus* Boheman, 1833 et *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera : Chrysomelidae : Bruchinae) par les huiles essentielles extraites d'*Origanum glandulosum* (Lamiacées). *Butlletin de la Institució Catalana d'Historia Natural*, 76: 177-186.
- [121] Revue Stratégique de la sécurité Alimentaire et Nutritionnelle en Algérie : (première partie). Analyse de l'état de la sécurité alimentaire et nutritionnelle en Algérie. CREAD, Mars 2018.
- [122] Trivedi, M.K., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Mondal, S.C., Jana, S. (2015). Evaluation of plant growth, yield and yield attributes of biofield energy treated Mustard (*Brassica Juncea*) and Chick pea (*Cicer arietinum*) seeds. *Agriculture, Forestry and Fisheries*, 4(6): 291-295.
- [123] Benzohra, I.E., Bendahmane, B.S., Youcef Benkada, M. (2016). Essais de lutte biologique in vitro par l'utilisation de *Trichoderma harzianum* et de *Trichoderma viride* contre [*Ascochyta rabiei*, agent de l'antracnose du pois chiche en Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides (JARA)*, 13 : 51-60.
- [124] Organisation des nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). (2016). Légumineuses : Des graines nutritives pour un avenir durable.
- [125] Abdelguerfi-Laouar M., Hamdi N., Bouzid H., Zidouni F. Laib M., Bouzid L et Zine F. Les Legumineuses alimentaires En Algérie : Situation, état des ressources phyto-genétiques et cas du pois chiche à Bejaia. In Actes des « 3èmes Journées Scientifiques de l'INRAA », Bejaia, 11-12 Février 2001, 171-189.
- [126] Belaid, D. (2016). La production du pois chiche en Algérie. *Collection Dossier Agronomique*.

- [127] Chougourrou, D.C., Alavo, T.B.C. (2011). Systèmes de stockage et méthodes endogènes de lutte contre les insectes ravageurs des légumineuses à grains entreposées au Centre Bénin. *Revue CAMES-Série A*, 12(2) : 137-141.
- [128] Toudert-Taleb, K., Hedjal-chebheb, M., Hami, H., Debras, J.F., Kellouche, A. (2014). Composition of essential oils extracted from six aromatic plants of kabylian origin (Algeria) and evaluation of their bioactivity on *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1175) (Coleoptera: Bruchidae). *African Entomology*, 22(2): 417-427.
- [129] Viaud, P. (1983). La protection des légumineuses contre les bruches : *Vigna unguiculata* et *Callosobruchus maculatus* [Col.] *Bulletin de la société entomologique de France*, 88(3-4), 241-249.
- [130] Balachowsky, A.S. (1962). Entomologie appliquée à l'agriculture, les coléoptères. Paris, Masson et Cie, T1. 564 P.
- [131] Guèye, M.T., Seck, D., Wathelet, J.P., Lognay, G. (2011). Lutte contre les ravageurs de stocks de céréales et de légumineuses au Sénégal et en Afrique occidentale : synthèse bibliographique. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(1), 183-194.
- [132] Ketoh, G. K., Glitho, I. A., Koumaglo, H. K (2004). Activité insecticide comparée des huiles essentielles de trois espèces du genre *Cymbopogon genus* (Poaceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 18: 21-34.
- [133] Toumno, Aba L., Seck , D., Namkossere, S., Cisse , N., Kandioura, N., Sembene., M. (2012). Utilisation des plantes indigènes à effet insecticide pour la protection des denrées stockées contre des insectes ravageurs à Boukoko (Centrafrique). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(3): 1040-1050.
- [134] Regnault-Roger, C., Bernard, J.R., Philogène, C.V. (2008). Biopesticides d'origine végétale. Paris: Tec et Doc, 2^{ème} édition. p : 202,211.
- [135] Ngamo, L. S. T., Hance, Th. (2007). Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *Tropicicultura*, 25(4), 215-220.
- [136] Kim, S., Roh, J., Kim, D., Lee, H., and Ahn, Y. (2003). Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*, 39: 293-303.
- [137] Abbott, W.S. (1925). A method for computing effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- [138] Finney D. J. (1971) Statistical method in biological assay. London, 2nd edition. Griffin, 333 p.

CHAPITRE II :

Recherches Bibliographique des Cistes

II.1 Introduction

Nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et biologique des huiles essentielles de trois espèces appartenant à la famille des Cistacées poussant en Algérie : *Cistus ladaniferus* L., *Cistus albidus* L. et *Cistus monspeliensis* L. le choix de ces trois plantes est basé sur une étude ethnobotanique sur l'utilisation de ces espèces par la population de la région de Tlemcen (Nord-Ouest du pays) et en une absence totale d'études chimiques sur la composition des huiles essentielles des trois cistes en Algérie. Très peu de travaux ont été mentionnés sur l'activité biologique des huiles essentielles des espèces choisies.

II.2 Présentation de la famille des Cistacées

La famille des Cistaceae (Cistacées) est une grande famille constituée de plantes dicotylédones, environ 175 espèces sont réparties en 8 genres distribués dans les zones tempérées de l'hémisphère nord et dans le sud du continent américain. La grande biodiversité de cette famille se situe dans le bassin méditerranéen [1-4].

Le genre *Cistus* est dominant dans cette famille avec plus de 25 espèces, certaines sont endémiques et d'autres distribuées partout, des îles Canaries aux montagnes du Caucase. L'abondance des espèces de ce genre se trouve principalement dans la partie Est de la méditerranée: en Espagne, en Portugal, dans le Nord-Est de l'Afrique, en Grèce et en Turquie. Cette répartition suit les conditions climatiques et le sol [5,6]. Les espèces les plus abondantes du bassin sont : *C. monspeliensis* L., *C. ladaniferus* L., *C. salviifolius* L., *C. laurifolius* L. et *C. albidus* L. [7].

Les cistes sont des arbustes, sous arbustes ou des plantes herbacées pérennes qui poussent dans les endroits ensoleillés sur des sols calcaires et siliceux. Elles sont pionnières des environnements dégradés résultant d'une perturbation humaine (incendies, débroussaillments, etc.). Le feu stimule la germination des cistes, ces espèces sont les premières à apparaître après les incendies [8-12].

Les feuilles des cistes sont simples, opposées sans stipule, ovales, oblongues ou lancéolées de couleurs vertes. Les fleurs sont hermaphrodites réunies en inflorescence ou solitaires avec trois à cinq sépales. Les pétales (au nombre de cinq) sont de couleurs allant du blanc au violet et au rose foncé avec une tache rouge foncé bien visible à la base de chaque pétale chez quelques espèces. Les étamines sont nombreuses et libres, le gynécée est formé par un ovaire de trois à cinq carpelles, le stigmate est capité ou discoïde. Le fruit est sous forme d'une capsule de 2 à 10 loges et valves. Les graines sont plusieurs généralement petite de formes tétraèdres ou subtrigones [13].

En Algérie, le genre *Cistus* L., est représentée par dix espèces : *C.ladaniferus* L., *C. sericeus* Munby (espèce endémique algéro-marocaine), *C. libanotis* L., *C. villosus* L., *C. heterophyllus* Desf., *C. salvifolius* L., *C. crispus* L., *C. albidus* L., *C. varius* Pourret et *C. monspeliensis* L. [14].

Ces arbrisseaux peuvent atteindre plus de 1,5 m de hauteur pour certaines espèces. Elles poussent sur des sols calcaires et siliceux dans les forêts, les broussailles, le long des côtes, dans l'Atlas tellien et les hauts plateaux de l'Algérie. Leur floraison s'effectue en printemps entre Avril et Juin [14].

Dans la région Ouest de l'Algérie et spécifiquement à Tlemcen, 8 espèces de ce genre ont été enregistrées, identifiées et répertoriées dans l'inventaire du parc national de la wilaya. Il s'agit de: *C. albidus* L., *C. arboreus* L., *C. crecus* L., *C. heterophyllus*, *C. ladaniferus* L., *C. monspeliensis* L., *C.salvifolius* L., et *C.villosus* L.

II.3 Description botanique des trois espèces de cistes [14]

II.3.1 *C. ladaniferus* L.

Arbuste très aromatique qui peut atteindre 2m de haut à feuilles planes ou simplement ondulées de 6mm de large, lancéolées, glabres, luisantes et résineuses en dessus. Les pédicelles droits sont cachés dans un amas de bractées ovoïdes, acuminées et soyeuses en dedans. Les sépales sont glabres mais ciliés, sub-orbiculaires, tuberculeux. Les capsules sont rondes et tomenteuses.

Les fleurs sont entièrement blanches ou guttés de pourpre (Figure 16) avec un style très court ou même nul, le stigmate est grand et discoïde et la capsule à 6-10 loges. Les graines sont petites, polyédriques, lisses ou à peine rugueuses. La plante pousse sur un sol calcaire dans les forêts et broussailles.



Fig.16 : *Cistus ladaniferus* L.
(Source : Bechlaghem Karima. Forêt de Hafir le 20.04.2014)

II.3.2 *C. albidus* L. [14]

Plante peu odorante dressé de 40 à 100cm de long à feuilles tomenteuses blanchâtres, velouté de poils étoilés. Les feuilles sont ovales, oblongues ou lancéolées avec une nervure principale bien saillante à la face supérieure et 3 à 5 nervures saillantes et anastomosées à la face inférieure. Les fleurs sont grandes de 5 à 6 cm de diamètre, solitaires ou (2-3) en ombelle. Les pièces de l'épicalice sont subcordiformes à la base. Les sépales sont amplement ovales à la base et atténués au sommet. Les pétales égalant 2 à 3 fois le calice. Les graines sont fovéolées. Cette espèce pousse dans les plaines et les basses montagnes surtout calcaires (Figure17).



Fig.17 : *Cistus albidus* L.

(Source : Bechlaghem Karima. Forêt d'ez Ziatine le 05.05.2014)

II.3.3 *C. monspeliensis* L. [14]

Arbrisseau d'1m de haut, velu-visqueux en toutes ses parties. Ses feuilles sont linéaires ou lancéolées, 1-3 nerviées, rugueuses à marges révolutes. Les fleurs sont blanches de 2-3 cm de diamètre, réunies en grappes unilatérales 2-8. Les pièces de l'épicalice sont subcordiformes à la base. Les sépales sont ovales à la base et atténués au sommet. Le style est très court avec un stigmate discoïde. La capsule est arrondie et oligosperme. La plante se dresse dans les forêts et dans les broussailles en terrain non calcaire (Figure 18).



Fig.18 : *Cistus monspeliensis* L.

(Source : Bechlaghem Karima. Forêt d'ez Ziatine le 05.05.2014)

II.4 Pratique traditionnelle et usage des plantes étudiées

Dans la région de Tlemcen, les trois espèces de cistes : *C.ladaniferus* L., *C. albidus* L. et *C.monspeliensis* L. sont connues sous le nom de « touzzala ».

Dans d'autres régions de l'Algérie, elles sont aussi appelées « Touzzala » ou « Touzzel » [15]. D'autres noms vernaculaires leur sont attribués : « Ouerd », « Atai », « Oum aliya », «Tame itibt » respectivement selon (Quezel et Santa) [14].

En thérapie traditionnelle locale, les infusions des feuilles de *C. ladaniferus* préviennent des maladies rénales. Les feuilles de *C. monspeliensis* sont mélangées (en infusion) avec les feuilles de quelques espèces telles que le thym et le myrte pour traiter les infections cutanées comme le prurit.

Une étude pharmacologique établie par le parc national de Chréa, a montré que les feuilles de *C. monspeliensis* utilisées en décoction, sont considérées comme anti-hémorragiques, anti-inflammatoires, et anti-diarrhéiques [16].

Dans l'usage traditionnel au Maroc, la décoction des feuilles de *C. ladaniferus* est utilisée pour traiter la diarrhée, les douleurs abdominales et les maux d'estomac [11]. En Grèce, L'infusion des feuilles de *C. monspeliensis* substitue le thé tandis que l'infusion des fleurs aide à soulager les crises d'asthme [17]. Dans le passé en Italie, les feuilles de *C. albidus* étaient séchées et utilisées comme du tabac [18].

L'usage ancestral des espèces de cistes a poussé plusieurs chercheurs à les investir pour les valoriser. Des études menées sur les extraits et sur les huiles essentielles des trois cistes, ont mis l'évidence à des activités antioxydantes, antimicrobiennes, activité inhibitrice de la cholinestérase, activité cytotoxique et antiproliférative [11,13, 17, 19-24].

II.5 Usage et application des cistes en industrie

Les huiles essentielles de quelques espèces de cistes sont appréciées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques [8, 25-26]. Les huiles essentielles ainsi qu'une résine obtenue de *C. ladaniferus* appelée *labdanum*, constituent 30% de la composition totale des parfums modernes. Le labdanum est considéré comme un fixateur naturel utilisé dans la production des parfums chyprés [1, 27].

Pour le genre *Cistus*, aucune information n'a été donnée concernant l'utilisation des extraits des espèces de ce genre en industrie alimentaire à part l'utilisation des résines de quelques espèces comme additifs alimentaires ou comme agents aromatisants [13].

II.6 Etude chimique des extraits de cistes

II.6.1 Introduction

Les recherches scientifiques citées dans la littérature illuminent des activités antimicrobiennes et antioxydantes intéressantes des extraits de cistes. Ces études révèlent un potentiel élevé de ces espèces que ça soit en huiles essentielles ou en extraits, du sûrement aux molécules bioactives présentes. Les résultats fournis pourront servir au futur pour exploiter ces espèces dans plusieurs domaines notamment le domaine de l'industrie alimentaire comme agents antimicrobiens et agents conservateurs.

Nous allons reprendre dans cette partie les principaux travaux réalisés sur trois espèces de ce genre: *C. ladaniferus* L., *C. albidus* L. et *C. monspeliensis* L.

II.6.2 Etude chimique

L'analyse du labdanum (résine odorante obtenue à partir des feuilles et rameaux de quelques espèces de ciste) est très complexe, elle a donné lieu à plusieurs études. Les constituants les plus caractéristiques du labdanum sont les diterpènes [28]. En effet, l'identification de la composition chimique de la fraction neutre du résinoïde du labdanum de *C.ladaniferus* par De Pascual Teresa et collaborateurs (mentionné par Paolini dans sa thèse [29]) a conduit à l'identification de 5 alcools dont 2 sesquiterpéniques (viridiflorol et lédol) et 3 diterpéniques (15-norlabdan-8- α -ol ; labd-8(17)- δ -15-ol ; 15-hydroxylabd-7- δ -6-one). Dans la fraction acide, les mêmes auteurs ont identifiés deux acides diterpéniques (7-oxo-labd-8- δ -15-oïque et le 6,8(17)-labd-15- δ -oïque) [30].

L'étude chimique du résinoïde labdanum, de la concrète et de l'absolue de *C. ladaniferus* par Greche et collaborateurs [26], a révélée la présence des composés majoritaires suivants : labd-14- δ -16,18-diol, labd-14- δ -8,13-diol, acide labdanolique , acide labda-7,8-dienoïque et l'acide 6-oxo cativique.

La fraction neutre et acide de la concrète obtenue des feuilles et rameaux de *C.monspeliensis* a été analysé dans un travail fait par Tabacik et Bard [31], L'extrait (neutre et acide) est constitué principalement par des molécules à squelette de type Cistane : L'acide 18-hydroxyciste-3(4)- δ -15-oïque, l'acide 18-acétoxyciste-3(4)- δ -15-oïque , ciste-3(4)- δ -15,18-diol (17%), l'acide 18-acétoxyciste-3(4)- δ -15-oïque.

Le travail de Viuda-Martos et collaborateurs [32], sur des extraits méthanoliques des feuilles de *C. ladaniferus* et *C. monspeliensis* a permis d'identifier par CLHP des flavonoïdes dont les composés les plus prédominants sont : 3,7-diméthyl-kaempférol et 3-méthyl-kaempférol.

L'analyse par CLHP de la composition polyphénolique des extraits aqueux de quelques espèces de cistes parmi eux : *C. ladaniferus*, *C. monspeliensis* et *C. albidus* a montré que les composés les plus caractéristiques de l'extrait aqueux de *C. ladaniferus* et *C. monspeliensis* sont les tanins ellagiques tant dis que pour *C. albidus* se sont les flavonoïdes représentés principalement par les flavanols (cathéchines) [5].

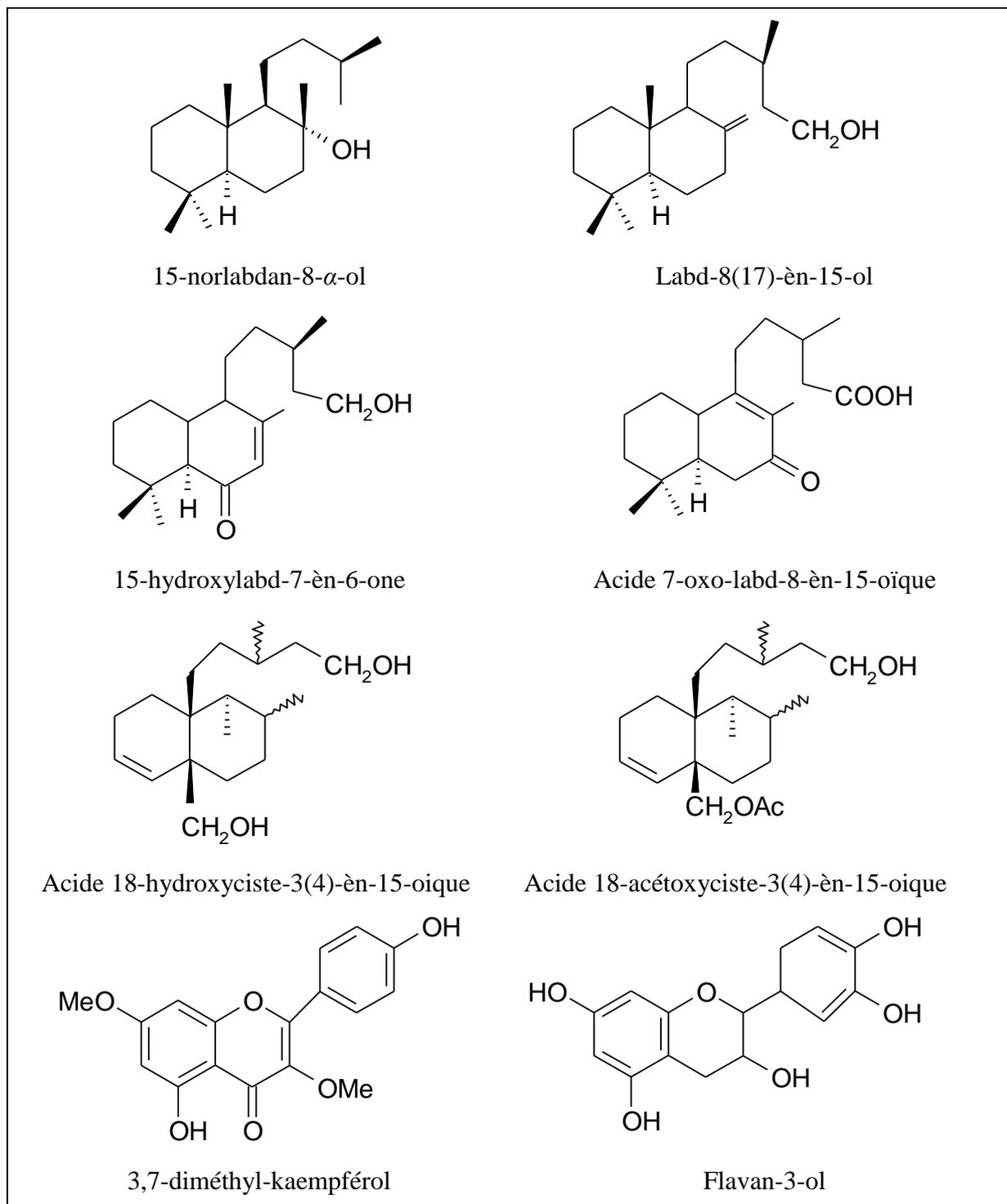


Fig. 19 : Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les extraits de : *C. ladaniferus* L., *C. monspeliensis* L. et *C. albidus* L.

CHAPITRE II : Recherche Bibliographique des Cistes

La composition chimique des huiles essentielles de *C. ladaniferus* L., *C. albidus* L. et *C. monspeliensis* L., a été étudiée par plusieurs auteurs des pays de la région méditerranéenne. Les composés majoritaires des huiles essentielles des trois cistes sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 02. Composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles des espèces étudiées
(CL : *C. ladaniferus* ; CA : *C. albidus* ; CM : *C. monspeliensis*)

<i>Cistus</i>	Composés Majoritaires	Références
CL	α -Pinène (43,2%), Camphène (12,2%), δ -Cadinène(6,57%)	[33]
	α -Pinène (39%), Viridiflorol (11,8%), Camphène (2,1%)	[34]
	Camphor (19,46%), Bornéol (4,40%), α -Pinène (4,19%),	[35]
	Viridiflorol (15,1%), α -Pinène (4,5%), <i>trans</i> -Pinocarvéol (3,8%)	[27]
	α -Pinène (2,5%), <i>p</i> -Cymène (2,3%)	[25]
	α -Pinène (47,1%), Camphène (5,0%), Globulol (6,2%)	[36]
	Viridiflorol (19,4%), Camphène (12,1%), α -Pinène (5%)	[26]
	Viridiflorol (16,4%), γ -Terpinène (6,1%), 4-Terpinéol (4,2%)	[32]
	<i>trans</i> -Pinocarvéol (20%), Viridiflorol(13,59%), 4-Terpinéol (6,37%)	[37]
Camphène (15,5%), Bornéol (11,1%), 4-Terpinéol (6,3%).	[11]	
CA	α -Zingibérène (20,7%), <i>ar</i> -Curcumène (13,2%), <i>épi</i> - α -Bisabolol (6,0%)	[38]
	α -Zingibérène (12,7%), <i>ar</i> -Curcumène (7,7%), β -Caryophyllène (5,9%),	[7]
CM	Oxyde de 13- <i>épi</i> -manoylé (39,69%), Kaur-16-ène (18,51%), Oxyde de caryophyllène (8,50%)	[17]
	Oxyde de 13- <i>épi</i> -manoylé (7,7%) ; 6, 10,14-triméthyl-2-pentadécane(4,3%)	[25]
	α -Pinène (5.6%), Nonanal (3,9%)	[32]
	Oxyde de 13- <i>épi</i> -manoylé (17,7%), Bornéol (6,3%), Kaur-16-ène (3,6%)	[24]

La composition chimique varie d'une espèce à une autre et le pourcentage des composés majoritaires varie d'une étude à une autre pour chaque espèce. Cette différence peut s'expliquer par l'origine de la plante, la partie de la plante utilisée ainsi que le mode d'extraction choisit.

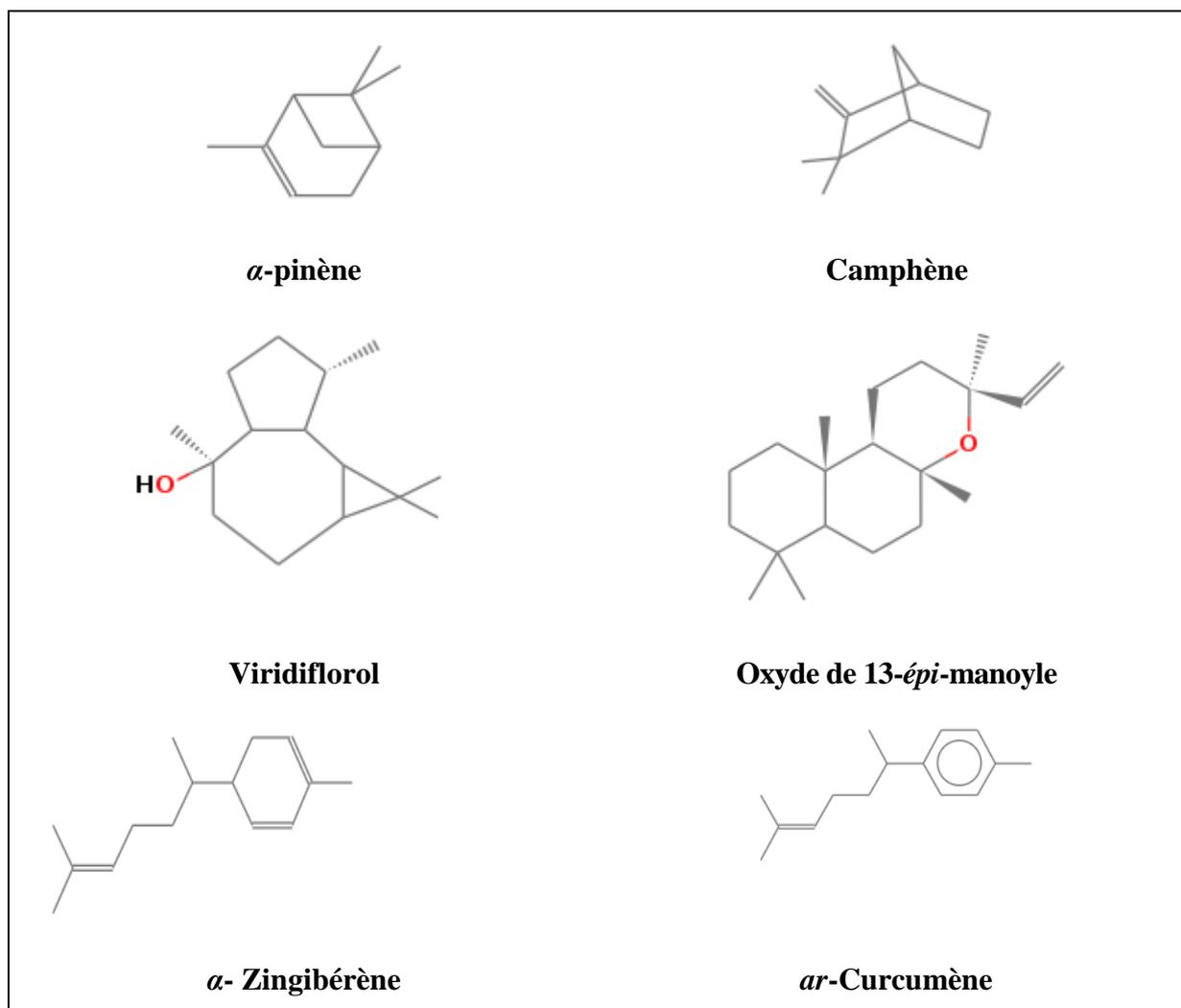


Fig.20 : Structures chimiques de quelques composés majoritaires des huiles essentielles des espèces étudiées (CL : *C. ladaniferus* ; CA : *C. albidus* ; CM : *C. monspeliensis*)

(Source : WebBook de Chimie NIST)

Références Bibliographiques

- [1] Iriondo, J.M., Moreno, C., Pérez, C. (1995). Micropropagation of six Rockrose (*Cistus*) Species. *Hortscience*, 30(5): 1080-1081.
- [2] Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A. (2000). Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biology and Toxicology*, 16: 83-90.
- [3] Başlar, S., Dogan, Y., Mert, H.H. (2002). A study on the soil- plant interactions of some *Cistus* L. species distributed in west Anatolia. *Turkish Journal of Botany*, 26: 149-159.
- [4] Mahmoudi, H., Aouadhi, C., Kaddour, R., Addour, M., Gruber, M., Zargouni, H., Zaouali, W., Benhamidal, N., Bennisri, M., Ouerghi, Z., Hosni, K. (2016). Comparaison of antioxidant and antimicrobial activities of two cultivated *Cistus* species from Tunisia. *Bioscience journal Uberlândia*, 32(1): 226-237.
- [5] Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micola, V. (2010). Systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochemical analysis*, 22(4): 303-312.
- [6] Ferrer-Gallego, P.P., Laguna, E., Crespo, M.B. (2013). Typification of six Linnaean names in *Cistus* L. (Cistaceae). *Taxon*, 62(5): 1046-1049.
- [7] Paolini, J., Tomi, P., Bernardini, A. F., Bradesi, Casanova, P., Kaloustian, J.J. (2008). Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combinaison of GC/RI, GC/MS and ¹³C- NMR spectroscopy. *Natural Product Research*, 22(14): 1270-1278.
- [8] Robles, C., Garzino, S. (1998). Essential oil composition of *Cistus Albidus* leaves. *Phytochemistry*, 48(8): 1341-1345.
- [9] Robles, C., Garzino, S., (2000). Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves, *Phytochemistry*, 53: 71-75.
- [10] Palá-Paúl, J., Velasco- Negueruela, A., Pérez-Alonzo, M., Sanz, J. (2005). Seasonal variation in chemical composition of *Cistus albidus* L. from Spain. *Journal of Essential Oil Research*, 17:19-22.
- [11] Zidane, H., Elmiz, M., Aouinti, F., Tahani, A., Wathélet, J., Sindic, M., Elbachiri, A., (2013). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 12(34): 5314-5315.

- [12] Kowalska, T., Sajewicz, M. (2016). Thin-layer chromatographic finger printing of the non volatile fraction extracted from the medicinal herb *Cistus incanus* L., *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. DOI: 10.1080/10826076.2017.1298033.
- [13] Barrajon-Catalan, L., Tomas-Menor, E., Morales-Soto, A., Marti Bruña, N., Lopez, S., Segura-Carretero, D.A., Micol, V. (2016). Rockroses (*Cistus* sp) Oils. In: Preedy, V.R., Essential oils in food preservation, flavor and safety. Academic Press, 649-658.
- [14] Quezel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales. Paris : Centre National De La Recherche Scientifique. Tome II, P : 693-698.
- [15] Foureau, F. (1896). Essai de catalogue des noms Arabes et Berbères de quelques plantes, arbustes et arbres Algériens et Sahariens ou introduits ou cultivés en Algérie. Paris : Challamel, A., p: 46.
- [16] Guide Illustré de la Flore Algérienne. (2012). p: 37.
- [17] Angelopoulou, D., Demetzos, C., Dimas, C., Perdetzoglou, D., Loukis, A. (2001). Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of *ent-13-epi-Manoyl Oxide* and its Isomers. *Planta Medica* , 30:189-203.
- [18] Macionni, S., Baldini, R., Cioni, P.L., Tebano, M., Flamini, G. (2007). *In vivo* volatils emission and essential Oils from different organs and pollen of *Cistus albidus* from Caprione (Easten Liguria, Italy). *Flavour and Fragrance Journal*, 22: 61-65.
- [19] Amensour, M., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J.A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J., Fernandez-López, J. (2010). Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 65: 170-178.
- [20] Gonçalves, S., Gomes, D., Costa, P., Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43: 465-471.
- [21] Bouamama, H., Noël, T., Villard, J., Benharref, A., Jana, M., (2006). Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 104-107.
- [22] Benayad, N., Mennane, Z., Charof, R., Hakiki, A., Mosaddak, M. (2013). Antibacterial activity of essential oil and some extracts of *Cistus ladaniferus* from Oulmes in Morocco. *Journal of Materials of Environmental Science*, 4(6): 1066-1071.
- [23] Benjemia, M., Kchouk, M.E., Senatore, F., Autore, G., Marzocco, S., De Feo, V., Bruno, M. (2013). Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chemistry Central Journal*, 7:47.

- [24] Loizzo, M. R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., Tundis, R. (2013). Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical toxicology*, 59: 586-594.
- [25] Loller-Lopez, J., Rodrigues, J.L., Cuerva, J.M., Oltra, J. E. (2005). Composition of the essential oils of *Cistus ladaniferus* and *Cistus monspeliensis* from Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 17: 553-555.
- [26] Greche, H., Mrabet, N., Zrira, S., Ismaili-Alaoui, M., Benjilali, B., Boukir, A. (2009). The Volatiles of the leaf oil of *Cistus ladanifer* L. var. *albiflorus* and labdanum extracts of moroccan origin and their antimicrobial activities. *Journal of Essential Oil Research*, 21: 166-173.
- [27] Gomes, P.B, Mata, G., Rodrigues, A.E. (2005). Characterization of the portuguese-grown *Cistus ladanifer* essential Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 17(2): 160-165.
- [28] Nicoletti, M., Toniolo, C., Venditti, A., Bruno, M., Ben Jemia, M. (2015). Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian *Cistus*: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*. *Natural Product Research*, 29(3): 223-230
- [29] Paolini, J. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du Carbone 13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Corse. P: 46.
- [30] De Pascual Tereza, J., Bellido, I.S., Basabe, P, Marcos, I.S, Ruano, L.F., Urones, J.G. (1982). Labdane diterpenoids from *Cistus ladaniferus*. *Phytochemistry*, 21(04): 899-901.
- [31] Tabacik, C., Bard, M. (1971). Etude chimio-taxonomique dans le genre *Cistus*. *Phytochemistry*, 10: 3093-3109.
- [32] Viuda-Martos, M., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J.A., Fernandez-Lopez, J. (2011). Identification of flavonoid content and chemical composition of the essential oils of Moroccan herbs: Myrtle (*Myrtus communis* L.), rockrose (*Cistus ladanifer* L.) and Montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 23(2): 1-9.
- [33] Gülz, P.G., Kobold, U., Michaelis, K., Vostrowsky, O. (1984). The Composition of terpene hydrocarbons in the essential oils from leaves of four *Cistus* species. *Zeitschrift für Naturforschung*, 39c: 699-704.
- [34] Mariotti, J. P., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., Bernardini, A. F. (1997). Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L., cultivated in Corsica (France). *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 147-151.

[35] Rincon, J., Delucas A, Gracia, I. (2000). Isolation of rock rose essential oil using supercritical CO₂ extraction. *Separation Science and Technology*, 35(16):2745-2763.

[36] Rossi, P.G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A. (2007). Antibacterial action of essential oils from Corsica. *Journal of Essential oil Research*, 19: 176-182.

[37] Verdeguer, M., Amparo Blazquez, M., Boira, H. (2012). Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*, 26(17): 1602-1609.

[38] Paul, J. P., Negueruela, A.V., Alonso, M.J.P., Sanz, J. (2005). Seasonal variation in chemical composition of *Cistus albidus* L. from Spain. *Journal of Essential oil Research*, 17:19-22.

CHAPITRE III :

Matériels et Méthodes

III. 1 Introduction

L'inventaire des espèces floristiques du parc national de Tlemcen se situant au nord-ouest de l'Algérie a recensé près de 863 espèces dont huit appartiennent au genre *Cistus*. Nous avons ciblé pour notre étude trois espèces de ce genre à savoir: *C. ladaniferus* L., *C. albidus* L. et *C. monspeliensis* L. L'enquête sur l'utilisation pharmacologique de ces trois espèces, a été menée chez les herboristes et les tradipraticiens de la ville de Tlemcen et elle a aboutit à une ignorance de ces espèces ainsi qu'à leurs thérapeutiques. L'enquête s'est élargie dans quelques régions de la wilaya ou elle a révélé l'emploi des espèces de cistes (connues sous le nom de « *Touzalla* ») dans la thérapeutique traditionnelle pour le traitement des maladies rénales, dermatologiques, etc.

III.2 Zone et période de récolte

La partie aérienne des trois espèces de cistes a été récoltée dans deux régions de la wilaya de Tlemcen. Il s'agit des forêts de Hafir et d'ez Ziatine (au sud-ouest et au nord-ouest respectivement de la ville de Tlemcen). Les coordonnées géographiques des deux lieux cités sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 03. Données géographiques et climatiques des zones d'études

Régions	Latitude (N)	Longitude (O)	Altitude (m)
Hafir	34°46'46"	01°26'15"	1270m
Ez Ziatine	35°7'60"	1°43'60"	319m

Les espèces récoltées dans la période de floraison en Mai 2014 sont identifiées par le Professeur Mohamed Bouazza du laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes naturels, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

III.3 Extraction des huiles essentielles

Il existe diverse méthodes pour extraire les huiles essentielles, celle la plus utilisée dans notre laboratoire étant l'hydrodistillation. La matière première est entièrement immergée dans l'eau qui est ensuite portée à ébullition. La vapeur d'eau emporte les composés volatils, le mélange est alors récupéré par condensation. L'eau et l'huile essentielle se sépare par différence de densité en ajoutant un déshydratant comme le sulfate de sodium anhydre.

L'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne des trois espèces de ciste a été réalisé à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Figure 21) suivant les normes de la pharmacopée européenne [1] :

500 g de plantes fraîches sont introduites dans un ballon contenant de l'eau. L'ensemble est chauffé jusqu'à ébullition pour 5 heures. L'huile essentielle obtenue est conservée dans des flacons en verre ambré à une température de 4 °C jusqu'à analyse.



Fig. 21 : Montage d'hydrodistillation de type Clevenger
(Source : Bechlaghem Karima)

Le rendement des huiles essentielles R^{dt} est calculé selon la formule suivante :

$$R^{dt} (\%) = (M_2 / M_1) \times 100$$

Avec :

M_2 : masse des huiles essentielles (g)

M_1 : masse de la matière végétale (g)

III.4 Analyse des huiles essentielles par CPG et CPG/SM

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Varian CP-3800, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un détecteur de masse à piège à ions Varian Saturn 2000, et d'une colonne capillaire DB5 (60 m×0,25 mm×0,25 μm). Les conditions suivantes ont été appliquées :

- Les programmations en température de l'injecteur et de la ligne de transfert sont de 220 à 240°C ;
- La température du four est programmée de 60°C à 240°C à 3°C/min ;
- Les températures de l'injecteur et des détecteurs ont été maintenues à 280 °C ;

- Les échantillons ont été injectés en mode split (1:30) en utilisant de l'hélium comme gaz porteur (1mL/min),
- Le volume injecté des échantillons est de 0,2 µL (solution à 10% en hexane).

L'analyse CPG-FID a été effectuée à l'aide d'un chromatographe HP5890 série II équipé d'un détecteur (FID) et d'une colonne capillaire de silice fondue HP-5 (30m×0,25mm ID×0,35mm). Les conditions d'analyse sont :

- La programmation de la température consiste en une élévation de 60°C à 240°C à 3 °C/min ;
- Les températures de l'injecteur et du détecteur sont 220°C et 250°C respectivement ;
- Les échantillons ont été injectés dans le mode split (1:30) en utilisant de l'hélium comme gaz porteur (1mL/min) ;
- Le volume d'injection de l'échantillon est de 0,5 µL (solution à 10% en hexane).

Pour chacun des composés, les indices de rétention sont calculés par extrapolation linéaire à partir des temps de rétention d'une série d'étalon de n – hydrocarbures. L'identification de chaque composé des mélanges a été réalisée par comparaison des indices de rétention avec ceux de composés standards dans les banques de données commerciales (NIST 2014 et ADAMS), des spectres de masse construits à partir de substances pures et de composants de mélanges connus (bibliothèque du laboratoire) et aussi de données SM de la littérature [2-5].

III.5 Evaluation des activités biologiques

III.5.1 Activité antioxydante

III.5.1.1 Test DPPH [6,7]

Le principe de la méthode est basé sur la mesure en spectrophotométrie du changement de couleur (du violet vers le jaune) du radical DPPH[•] en présence de molécules antioxydantes : 1 mL d'une solution de DPPH dans l'éthanol (0.006%) est mélangé avec un volume égal des solutions d'huiles essentielles à différentes concentrations (20 à 4,74 mg/mL). Le mélange est maintenu dans l'obscurité pendant 1 heure. L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometer, Optizen POP).

Le contrôle négatif est composé d' 1mL de la solution éthanolique du DDPH et d'1mL d'éthanol tandis que le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

La diminution de l'absorbance de la solution DPPH[•] indique une augmentation de l'activité de piégeage des radicaux DPPH[•].

- **Expression des résultats**

L'activité anti-radicalaire de l'échantillon, à un temps t, à une concentration donnée et à température ambiante est exprimée par le pourcentage d'inhibition des radicaux libres (I%) selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (I\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec :

- ✓ A_0 : Absorbance du contrôle (absorbance de la solution de DPPH en absence de l'échantillon).
- ✓ A_1 : Absorbance de la solution de DPPH en présence de l'échantillon.

- **Calcul de CI_{50}**

La concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée EC_{50} pour Efficient Concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les CI_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés (pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations testées).

III.5.1.2 Méthode de la réduction du Fer (FRAP)

L'activité réductrice du fer dans les extraits est déterminée selon la méthode décrite par (Oyaizu, 1986) [8], basée sur la réduction du Fe^{III} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{II} :

Un millilitre des huiles essentielles à différentes concentrations (de 0,05 à 0,01 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes puis 2,5 ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [9].

III.5.1.3 Test de blanchiment de β -carotène

La technique consiste à mesurer à 470 nm la décoloration du β -carotène oxydé par les radicaux peroxydes régénérés par la dégradation de l'acide linoléique. La méthode employée est celle décrite par Mighri et collaborateurs [10]:

2 mg de β -carotène sont solubilisées dans 10 mL de chloroforme. 1 mL de cette solution est prélevé dans un bécher contenant préalablement 20 μ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme, un volume de 50 mL d'eau oxygénée est ajouté. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. 5 mL de l'émulsion précédente sont transférés dans des tubes contenant 500 μ L de la solution des huiles essentielles ou de l'antioxydant de synthèse (BHT) à différentes concentrations. Les tubes sont ensuite placés dans un bain marie à 50°C pendant 120 min. L'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à $t = 120$ min.

- **Expression des résultats**

L'activité antioxydante (%) des huiles essentielles, du BHT est évaluée en termes de blanchiment de β -carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A_{E(120)} - A_{C(120)}) / (A_{C(0)} - A_{C(120)})] \times 100$$

Avec :

- ✓ $A_{E(120)}$: Absorbance de l'échantillon à 120 min.
- ✓ $A_{C(120)}$: Absorbance du contrôle (l'échantillon est remplacé par de l'éthanol) à 120 min.
- ✓ $A_{C(0)}$: Absorbance du contrôle à 0 min.

III.5.2 Activités antimicrobiennes

III.5.2.1 Microorganismes et conditions de culture

Les tests sont effectués sur 13 souches microbiennes de référence (ATCC) « *American Type Culture Collection* », provenant de l'Institut Pasteur d'Oran. Les microorganismes utilisés sont :

- **Six bactéries à Gram-positif :**

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Micrococcus luteus* ATCC9341.

- **Cinq bactéries à Gram-négatif :**

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, *Escherchia coli* ATCC 25912, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

- **Deux levures :** *Candida albicans* ATCC 10231(multi résistantes) et *Candida albicans* ATCC 26790.

- **Inoculum**

L'inoculum bactérien est préparé à partir d'une culture jeune de 18 à 24 h sur gélose nutritive. 4 ou 5 colonies d'une culture pure sont suspendues sur un bouillon nutritif (ou eau physiologique 0,9% en NaCl), ensuite la suspension est ajustée à 0,5 McFarland à l'aide d'un spectrophotomètre ce qui correspond à une densité optique entre 0,08 à 0,1 lue à 625nm. Le 0,5 McFarland est équivalent à 10^8 UFC/mL.

Pour les levures, l'inoculum équivalent à 0,5 McFarland est réalisé dans les mêmes conditions que les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0,12 à 0,15 à une longueur d'onde de 530nm [11].

III.5.2.2 Méthode de diffusion sur disque

Cette méthode est réalisée à partir du même principe de l'antibiogramme, selon les normes du *Clinical and Laboratory Standard Institut* [11]. Elle est basée sur la diffusion des substances à tester selon un gradient de concentration [12].

Au cours de cette étude la méthode de diffusion des disques choisie pour réaliser le test est comme suit :

L'ensemencement est réalisé par un écouvillon stérile à partir d'un inoculum contenant 10^8 UFC/ml (cité ci-dessus). Des disques en papier filtre type wattman n°3, de 6 mm de diamètre ont été préparés et stérilisés à 121°C pendant 15min. Ces disques ont été imprégnés par 5, 10, 15, 20, 25 et 30 μ L des solutions des huiles essentielles [13-14]. Ensuite, à l'aide d'une pince, les disques chargés d'huiles essentielles sont transférés dans la boîte inoculée. L'incubation dure de 18-24 h à 37°C pour les bactéries et de 20- 24h à 35°C pour les levures sauf que l'incubation a été prolongée de 12 h pour la souche *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 à cause de sa croissance lente.

La mesure des zones d'inhibition pour la lecture est effectuée à l'extérieur de la boîte fermée à l'aide d'une règle graduée. Elle est réalisée en prenant la moyenne de trois mesures différentes de diamètre. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix.

La souche ayant un diamètre (D) : $D < 8\text{mm}$: Souche résistante (-) ; $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$: Souche sensible (+) ; $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$: Souche très sensible (++) ; $D > 20\text{mm}$: Souche extrêmement sensible (+++) [15].

➤ **Antibiogramme**

L'antibiogramme a été réalisé par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, deux antibiotiques ont été testés : la Gentamicine (10 μg /disque) et l'Amphotéricine (100 μg /disque).

III.5.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) [11]

• **Méthode de Microplaque à 96 puits**

A la différence de la méthode de diffusion, la méthode de dilution permet de tester les produits directement mélangés avec le milieu de culture.

C'est une méthode quantitative qui nous a permis d'évaluer, dans le cas où il y a présence d'une activité (détectée par la méthode précédente), le seuil minimum de cette activité appelée couramment la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Une série de dilutions dans le DMSO (de 40mg/mL à 0,08 mg/mL) ont été préparé à partir d'une solution mère d'huile essentielle. La plaque à microtitration ,96 puits à fond plat, a été préparée comme suit :

Les puits 1 à 12 sont remplis par 198 μL de milieu de culture inoculé (10^5 UFC/mL pour les bactéries) et 10^6 UFC/mL pour les levures). 2 μL de la dilution correspondante sont ajoutés dans les puits 1 à 11 (volume final dans chaque puits est de 200 μL). Le puit numéro 11 sert de témoin positif (milieu avec souche), et le puit 12 sert de témoin négatif (milieu seul). L'incubation se fait à 37 °C pour 24 h. La lecture est effectuée à l'œil nu et la CMI correspond à la plus faible concentration de la substance testée auquel aucun trouble visuel n'est observé.

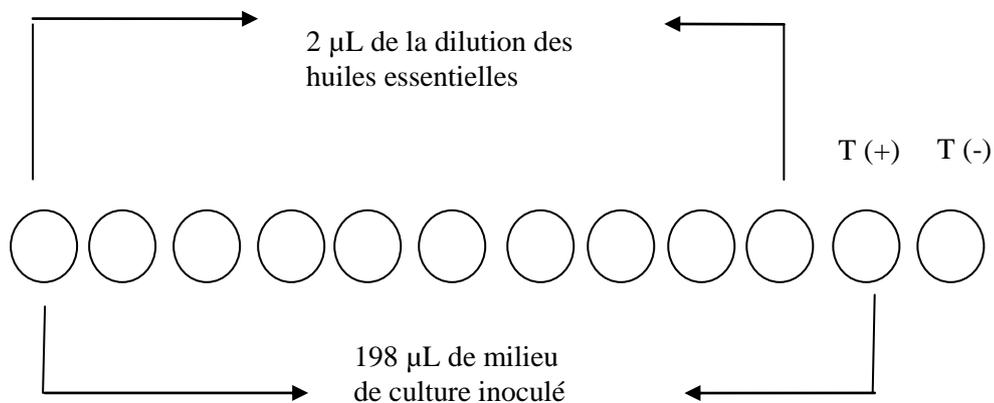


Fig. 22 : Schéma explicatif de la méthode de microplaque

T (+) : Témoin positif ; T(-) : Témoin négatif

- **Analyses statistiques**

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel PAST 3.03

III.5.3 Evaluation de l'activité enzymatique

L'évaluation de la capacité hypoglycémiante des huiles essentielles de *C. ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis* est déterminée par une étude *in vitro*, en effectuant un dosage colorimétrique des sucres réducteurs provenant de la dégradation de l'amidon par l'enzyme α -amylase selon Benfeld [16]. Le dosage s'effectue par le DNSA (l'acide 3,5-dinitrosalicylique). A chaud et en milieu alcalin, l'acide 3,5-dinitrosalicylique se réduit en l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui absorbe fortement la lumière visible à 540 nm.

III.5.3.1 Préparation des réactifs [16]

- **Réactif 3,5- dinitrosalicylique (DNSA)**

1g de DNSA est solubilisé dans 40mL d'eau distillée. A cette solution 30g de tartrate double de sodium et potassium sont ajoutés sous agitation. La solution obtenue est de couleur jaune opaque. L'addition de 20 mL d'une solution de NaOH (2N) rend le réactif limpide d'une couleur orange. Le volume obtenu est ajusté à 100mL avec de l'eau distillé. Le réactif ainsi préparé est conservé à l'abri de la lumière à 4°C.

- **Solution tampon phosphate (0,02M ; pH = 6,9)**

Cette solution est préparée à partir d'une solution A monobasique (NaH_2PO_4) (M=119,98g/mole) et une solution B dibasique (Na_2HPO_4) (M= 141,96 g/mole).

- **Solution de l' α - amylase**

L'enzyme utilisée est l' α -amylase (E.C.3.2.1.1) du pancréas du porc (PPA) (Sigma-Chemical).

3 mg de l' α -amylase sont dissoutes dans 10 mL de solution tampon phosphate (0,02M, pH=6,9). La solution obtenue contient une activité α -amylasique de 3,9 UI/mL.

- **Solution de substrat**

Une solution à 1% est préparée en solubilisant 1g d'amidon de pomme de terre (Merck) dans 100 mL d'une solution tampon phosphate (0,02M, pH=6,9).

- **Solution d'extrait**

Les huiles essentielles sont solubilisées dans une solution DMSO à 10% dans le tampon phosphate (0,02M, pH=6,9), ensuite diluées dans le tampon afin de préparer une gamme de concentrations pour les tester.

La méthode est réalisée suivant le protocole expérimental décrit par Thalapaneni et collaborateurs [17], avec quelques modifications. Brièvement, une série de tubes sont préparés comme suit :

- ✓ Tube blanc (pour le contrôle) : 1 mL de solution tampon + 0,5 mL d'amidon.
- ✓ Tube blanc (pour les extraits) : 0,5 mL de solution de tampon + 0,5 mL de solution d'extrait + 0,5 mL d'amidon.
- ✓ Tube contrôle : 0,5 mL de tampon phosphate + 0,5 mL d'amidon + 0,5 mL de solution enzymatique.
- ✓ Tube d'essai : 0,5 mL de solution d'amidon + 0,5 mL de solution d'extrait + 0,5 mL de solution enzymatique.

Les tubes sont incubés ensuite pendant 15 mn à 37 °C. 1 mL du réactif DNSA est rajouté, les tubes sont après mis dans un bain marie à 100°C pendant 8 mn puis dans un bain d'eau glacée. La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm.

• Expression des résultats

Le Calcul du pourcentage d'inhibition de chaque concentration d'extrait ou d'acarbose « LARIMEL®50 » (molécule de référence) se fait selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Avec :

- ✓ $A_{\text{contrôle}}$: Absorbance du contrôle
- ✓ A_{extrait} : Absorbance de l'extrait

L'activité enzymatique est déterminée en calculant la CI_{50} (représente la concentration de l'extrait inhibant 50% de l'activité enzymatique) déterminée graphiquement en traçant le (%) d'inhibition en fonction des concentrations des extraits ou de l'acarbose.

III.5.4 Activité insecticide

Nous avons testé la toxicité des huiles essentielles extraites de la partie aérienne des trois espèces de cistes sur une espèce d'insecte nuisible appartenant à la famille des *Bruchidae* et dont le développement post-embryonnaire s'effectue dans les graines des légumineuses (Fabacées). Il s'agit du bruche de pois-chiche *Callosobruchus maculatus* (Fabricius 1775).

III.5.4.1 Élevage des insectes

Des élevages ont été mis en place afin d'obtenir les adultes de l'espèce de bruches considérées. Ces élevages de masse sont effectués dans des bocaux en verre (18 cm de hauteur et 15 cm de diamètre). Nous avons utilisé comme substrat alimentaire 500 g des graines de pois chiche contaminées par *C. maculatus* provenant d'un entrepôt de stockage de la région de Tlemcen (Algérie). Les bocaux ont été placés dans une étuve réglée à une température de 27 °C et à une humidité relative de 75 % [18]. Les graines infestées ont été laissées en incubation jusqu'à l'apparition des nouveaux adultes qui seront retirés par la suite pour la réalisation des testes insecticides.



Fig. 23 : Elevage de masse de *C.maculatus*

III.5.4.2 Evaluation de la toxicité des huiles essentielles sur *C.maculatus*

Des solutions d'huiles essentielles ont été préparées dans l'acétone à des concentrations (2, 5 et 10 μ L/mL) pour chaque espèce de ciste. Puis 1 mL de chaque concentration d'huile est ajouté à 10 g de graines qui sont préalablement été mises dans des boîtes de Pétrie. L'ensemble est mélangé (Figure 24). Les doses testées sur *C. maculatus* sont de 2 μ L/10g de graines, 5 μ L/10g de graines et 10 μ L/10g de graines. Toutes les boîtes sont infestées par cinq couples de *C. maculatus* (âgés de 48h). Des boîtes témoin ont été préparées en mélangeant 10 g de graines avec l'acétone seulement. Les essais sont répétés 3 fois pour chaque dose y compris le témoin.

Le comptage des insectes morts a été réalisé chaque 24 heures pendant une période de deux jours [18].

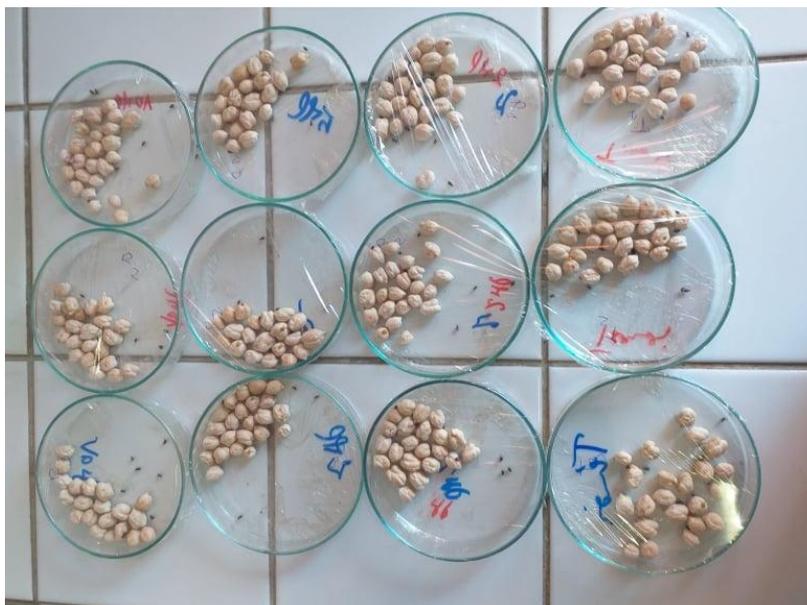


Fig.24 : Effet des huiles essentielles sur *C.maculatus*

- **Estimation de la mortalité et calcul de la DL₅₀ et DL₉₀**

Le pourcentage de mortalité est exprimé après correction par la formule d'Abbott [19] :

$$P_c = [P_o - P_t / 100 - P_t] \times 100$$

Avec

P_c : mortalité corrigée en %,

P_t : mortalité observée dans le témoin

P_o : mortalité observée dans l'essai

Les pourcentages de mortalité sont transformés en probits [20], la régression des probits en fonction du logarithme de la dose a permis de déterminer la DL₅₀ et la DL₉₀ pour chaque huile essentielle.

- **Action des pesticides sur la mortalité de l'insecte étudié**

Pour comparer l'efficacité de nos huiles essentielles, nous avons utilisé « Decis, 25 EC » qui est un insecticide chimique à base de deltaméthrine (substance active de la famille des pyréthrinoïdes de synthèse) avec une teneur en matière active de 25g/L. Le même protocole expérimental a été suivi avec les mêmes doses.

- **Analyses statistiques**

Les résultats obtenus sont soumis aux tests de l'analyse de variance ANOVA I (univarié) et de Tukey dans le but d'étudier l'effet des huiles essentielles ainsi que l'insecticide chimique à différentes doses sur la mortalité des adultes de *C. maculatus*.

L'effet variable est significatif lorsque la probabilité de l'erreur réellement commise est :

- ✓ $P = 0.001$ Très hautement significatif.
- ✓ $P = 0.01$ Hautement significatif.
- ✓ $P = 0.05$ Significatif.

Références Bibliographiques

- [1] Clevenger, J. F. (1928). Apparatus for the Determination of Volatile Oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association*, (1912), 17(4): 345–349.
- [2] Swigar, A.A., Silverstein, R.M. (1981). Monoterpenes. Milwaukee: Aldrich Chemical Compagny.
- [3] Joulain, D., Koing W.A. (1998). The Atlas of spectral data of sesquiterpenes hydrocarbons. Hamburg: EB-Verlag.
- [4] Davies, N.W. (1990). Gas chromatographic retention indexes of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowas 20M phases. *Journal of Chromatography A*, 503: 1-24.
- [5] Adams, R.P. (1995). Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured publishing, Carol stream.
- [6] Brand-Williams, W., Cuvevier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel – Wissenschaft und –Technologie*, 28: 25-30.
- [7] Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- [8] Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.
- [9] Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76.
- [10] Mighri, H., Hajlaoui, H., Akrou, A., Najjaa, H., Neffati, M. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes rendus Chimie*. 13: 380-386.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute- 2010. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 8th Edition. Pennsylvania, USA: Wayne, PA.
- [12] Cos P., Arnold J.V., Dirk V.B. et Louis M., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in “vitroproof-of-concept”. *Journal of Ethnopharmacology*. 106: 290-302.
- [13] Awadh Ali N.A., Jülich W.D., Kusnick C. et Lindequist U. (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 74: 173–179.
- [14] Elgorashi, E.E. et Van Staden J., (2004). Pharmacological screening of six *Amaryllidaceae* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 90: 27–32.

- [15] Ponce, A.G, Roura, S.I, Del Valle, C.E., Moreira,M.R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts : *Invitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 294-300.
- [16] Bernfeld, P. (1955). "Amylases, alpha and beta". *Methods in enzymology*, 1: 149-158.
- [17] Thalapaneni, N. R., Chidambaram, K. A., Ellappan, T., Sabapathi, M. L., Mandal, S. C. (2008). Inhibition of carbohydrate digestive enzymes by *Talinum portulacifolium* (Forssk) Leaf Extract. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 5(1).
- [18] Kellouche A., Soltani, N. (2004). Activité biologique des poudres de cinq plantes de l'huile essentielle d'une d'entre elles sur *Callosobruchus maculatus* (F.). *International Journal of Tropical Insect Science*, 24 (1), 184–191.
- [19] Abbott, W.S. (1925). A method for computing effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- [20] Finney D. J. (1971) *Statistical method in biological assay*. London, 2nd edition. Griffin, 333 p.

Chapitre IV

Résultats et Discussion

IV. 1 Analyse chimique de quelques espèces du genre *Cistus*

IV.1.1 Introduction

Ce travail vise l'étude de la composition chimique et des activités biologiques des huiles essentielles de la partie aérienne de trois espèces de cistes poussant en Algérie. Plusieurs travaux ont rapportés les activités antioxydantes, antimicrobiennes et insecticides des huiles essentielles. Dans la majorité des cas, ces activités ont été attribuées au terpénoïdes [1]. En examinant les travaux réalisés sur les huiles essentielles des trois espèces de cistes dans le pays, nous avons constaté l'absence d'une étude approfondie de la composition chimique des huiles essentielles. D'autre part, très peu d'études biologiques des huiles essentielles ont été publiées. Pour ces raisons, nous avons mené l'investigation de ces plantes pour confirmer leurs utilisations pharmacologiques ancestrales sur la base d'une étude scientifique rationnelle.

IV.1.2 Extraction des huiles essentielles des cistes

La partie aérienne de *C. ladaniferus* L. a été cueillit dans les monts de Tlemcen au sud ouest précisément dans la forêt d'Hafir tandis que celle de *C. alidus* L. et *C. monspeliensis* L. a été récoltée au nord-ouest dans la région d'ez Ziatine.

Les huiles essentielles des trois espèces ont été obtenues par hydrodistillation de la plante fraîche au moyen d'un appareil type Clevenger. La couleur des huiles essentielles est jaune clair voir orange pâle. La senteur des volatils est intense. Les rendements obtenus varient de 0,08 à 0,003%.

Tableau 04. Rendement des huiles essentielles des différents cistes

	<i>C. ladaniferus</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. monspeliensis</i>
Rendement (%)	0,08	0,02	0,003

Le rendement des huiles essentielles diffère d'une espèce à une autre, il ne faut pas négliger ici l'impact du climat sur le rendement et la qualité mais aussi celui de la zone géographique ainsi que la période et le moment de la récolte. Ces facteurs influent sur la production des métabolites secondaires dans les plantes [2].

IV.1.3 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles ainsi obtenues sont soumises à des analyses chimiques afin de déterminer leurs compositions chimiques. Le couplage CPG-FID et CPG/SM révèle un profil

chimique différent des trois espèces. Les composés identifiés ainsi que leur pourcentage d'abondance sont listés dans le Tableau 05.

- ***C. ladaniferus* L.**

Trente deux composés ont été identifiés représentant 99,6% de l'huile totale du *C. ladaniferus* L. (Tableau 05). Les huiles essentielles sont composées majoritairement par les dérivés terpénoïdes. Les composés oxygénés se trouvent à un pourcentage élevé, huit monoterpènes oxygénés (27,5%) et neuf sesquiterpènes oxygénés (30,0%). Huit monoterpènes hydrocarbonés sont présents (25,6%) accompagnés de six sesquiterpènes hydrocarbonés (12,6%). Les composés majoritaires de l'huile sont : 5,7-di-*épi*- α -eudesmol (13,6%), bornéol (12,5%), camphène (12,2%), δ -cadinène (7,6%), viridiflorol (6,4%), 4-terpinéol (5,7%) et l' α -pinène (4,2%) (Figure 25).

- ***C. albidus* L.**

En examinant le profile chimique des volatils de la partie aérienne de *C. albidus*, nous remarquons qu'il est constitué seulement et majoritairement par les sesquiterpènes (Tableau 05). Trente et un composés sont identifiés symbolisant 93,4% des huiles essentielles entières, dont quinze sesquiterpènes hydrocarbonés (48,6%) et seize sesquiterpènes oxygénés (44,8%). Les principaux composés sont : *épi*- α -bisabolol (11,4%), β -bourbonène (8,7%), *ar*-curcumène (8,3%), α -zingibérène (7,4%), γ -muurolène (5,6%), 14-Hydroxy- α -urolène (5,2%), β -caryophyllène (4,5%), 1,10-di-*épi*-cubéol (4,4%), t-cadinol (4,0%), δ -cadinène (3,1%), *ar*-turméról (2,9%), 1-*épi*-cubéol (2,9%), oxyde de caryophyllène (2,8%), t-muurolol (2,5%), α -guaïene (2,4%) et α -eudésmol (2,2%) (Figure 26).

- ***C. monspeliensis* L.**

L'investigation des huiles essentielles isolées de la partie aérienne de *C. monspeliensis* poussant en Algérie a conduit à l'identification de trente sept composés qui représentent 90,3% de l'huile totale. Différentes classes chimiques ont été caractérisées avec une absence totale des monoterpènes hydrocarbonés (Tableau 5).

En détail : quatre monoterpènes oxygénés (3,7%), deux sesquiterpènes oxygénés (2,4%), trois sesquiterpènes hydrocarbonés (3,7%), deux diterpènes hydrocarbonés (11,4%), deux diterpènes oxygénés (28,6%), dix apocarotènes (16,7%) et quatorze dérivés non terpéniques (23,9%).

Les composés majoritaires de l'huile sont : *épi*-13-oxide de manoyl (28,6%), kaur-16-ène (8,1%), nonanal (5,4%), *cis*- α -ambrinol (3,3%) et (*E*)- α -ionone (3,0%) (Figure 27).

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Tableau 05. Composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *C. ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis*

No. ^a	Composés	IR ^b	Huiles Essentielles (%) ^c			Identification ^e
			<i>C. ladaniferus</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. monspeliensis</i>	
1	(<i>E</i>)-3-Hexène-1-ol	853	nd ^d	nd	1,2	IR, SM
2	Tricyclène	928	2,9	nd	nd	IR, SM
3	α -Pinène	941	4,2	nd	nd	IR, SM
4	Camphène	955	12,2	nd	nd	IR, SM
5	Sabinène	977	0,6	nd	nd	IR, SM
6	6-Méthyl-5-heptène-2-one	987	nd	nd	0,9	IR, SM
7	2-Méthyl-2-heptène-4-one	997	nd	nd	2,4	IR, SM
8	α -Terpinène	1020	0,8	nd	nd	IR, SM
9	<i>p</i> -Cymène	1028	2,2	nd	nd	IR, SM
10	Cistus cyclohexanone (syn. 2,2,6-triméthylcyclohexanone)	1035	3,9	nd	nd	IR, SM
11	γ -Terpinène	1063	1,9	nd	nd	IR, SM
12	1-Octanol	1071	nd	nd	1,0	IR, SM
13	Terpinolène	1090	0,8	nd	nd	IR, SM
14	Linalool	1101	nd	nd	0,9	IR, SM
15	Nonanal	1104	nd	nd	5,4	IR, SM
16	α -Campholéal	1127	1,0	nd	nd	IR, SM
17	<i>trans</i> -Pinocarvéol	1141	3,0	nd	nd	IR, SM
18	3-Nonène-2-one	1143	nd	nd	1,9	IR, SM

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

19	Camphor	1145	1,7	nd	nd	IR, SM
20	Camphène hydrate	1150	0,9	nd	nd	IR, SM
21	<i>p</i> -Vinylanisole	1154	nd	nd	1,0	IR, SM
22	(<i>E</i>)-2-Nonéal	1163	nd	nd	0,9	IR, SM
23	Pinocarvone	1164	1,4	nd	nd	IR, SM
24	Bornéol	1167	12,5	nd	0,9	IR, SM
25	4-Terpinéol	1179	5,7	nd	0,9	IR, SM
26	Myrténol	1195	1,3	nd	nd	IR, SM
27	β -Méthyl- γ -octalactone	1196	nd	nd	0,8	IR, SM
28	Safranal	1197	nd	nd	1,1	IR, SM
29	β -Cyclocitral	1222	nd	nd	1,5	IR, SM
30	β -cCyclohomocitral	1256	nd	nd	1,0	IR, SM
31	(<i>E</i>)-2-Décenal	1263	nd	nd	1,2	IR, SM
32	Acide nonanoïque	1281	nd	nd	1,4	IR, SM
33	Carvacrol	1301	nd	nd	0,9	IR, SM
34	Decahydro-1,5-diméthyl naphthalène	1305	nd	nd	1,6	IR, SM
35	Theaspirane II	1315	nd	nd	0,9	IR, SM
36	(<i>Z</i>)-3-Hexényl 2-méthylcrotonate	1324	nd	nd	1,4	IR, SM
37	α -Longipinène	1352	nd	1,2	nd	IR, SM
38	α -Cubébène	1352	1,0	nd	nd	IR, SM
39	Longicyclène	1373	1,2	nd	nd	IR, SM
40	α -Copaène	1377	nd	1,0	1,2	IR, SM
41	β -Bourbonène	1385	nd	8,7	nd	IR, SM

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

42	β -Cubébène	1391	1,0	0,8	nd	IR, SM
43	<i>iso</i> -Italicène	1399	nd	0,5	nd	IR, SM
44	<i>trans</i> - α -Ambrinol	1414	nd	nd	1,5	IR, SM
45	β -Caryophyllène	1419	nd	4,5	1,0	IR, SM
46	7,8-Dihydro-3,4-dehydro- β -ionone	1424	nd	nd	1,4	IR, SM
47	(<i>E</i>)- α -Ionone	1428	nd	nd	3,0	IR, SM
48	β -Copaène	1430	nd	1,4	nd	IR, SM
49	<i>cis</i> - α -Ambrinol	1437	nd	nd	3,3	IR, SM
50	α -Guaïène	1440	nd	2,4	nd	IR, SM
51	α -Humulène	1456	nd	1,5	nd	IR, SM
52	Alloaromadendrène	1462	nd	1,0	nd	IR, SM
53	γ -Gurjunène	1474	nd	nd	1,5	IR, SM
54	<i>trans</i> -Cadin-1(6),4-diène	1475	1,0	nd	nd	IR, SM
55	γ -Muuroène	1479	nd	5,6	nd	IR, SM
56	<i>ar</i> -Curcumène	1483	nd	8,3	nd	IR, SM
57	(<i>E</i>)- β -ionone	1487	nd	nd	1,6	IR, SM
58	<i>trans</i> -Muuro-4(14),5-diène	1493	0,8	nd	nd	IR, SM
59	<i>epi</i> -Cubébol	1494	1,6	nd	nd	IR, SM
60	α -Zingibérène	1496	nd	7,4	nd	IR, SM
61	<i>trans</i> - γ -Cadinène	1514	nd	1,2	nd	IR, SM
62	Cubébol	1515	1,2	nd	nd	IR, SM
63	δ -Cadinène	1524	7,6	3,1	nd	IR, SM
64	8,14-Cedranoxide	1540	nd	0,6	nd	IR, SM

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

65	(Z) Benzoate-3-Hexényl	1570	nd	nd	2,8	IR, SM
66	Spathuléol	1577	nd	1,3	nd	IR, SM
67	<i>ar</i> -Turméról	1581	nd	2,9	nd	IR, SM
68	Oxyde de Caryophyllène	1582	1,6	2,8	nd	IR, SM
69	Globulol	1584	nd	1,8	nd	IR, SM
70	Gleenol	1586	0,7	nd	nd	IR, SM
71	Viridiflorol	1591	6,4	nd	0,9	IR, SM
72	<i>cis</i> -Arteannuic alcohol	1595	0,7	nd	nd	IR, SM
73	5,7-di- <i>épi</i> - α -Eudesmol	1603	13,6	nd	nd	IR, SM
74	Epoxyde II- α -Humulène	1607	nd	0,5	nd	IR, SM
75	1,10-di- <i>épi</i> -Cubénol	1615	nd	4,4	nd	IR, SM
76	1- <i>épi</i> -Cubénol	1628	2,6	2,9	nd	IR, SM
77	T-Cadinol	1641	nd	4,0	nd	IR, SM
78	Cubénol	1642	1,6	nd	nd	IR, SM
79	T-Muurolol	1642	nd	2,5	nd	IR, SM
80	α -Eudesmol	1654	nd	2,2	nd	IR, SM
81	<i>cis</i> - α -Santalol	1682	nd	0,6	nd	IR, SM
82	<i>épi</i> - α -Bisabolol	1686	nd	11,4	nd	IR, SM
83	<i>ar</i> -Curcumén-15-al	1710	nd	1,2	nd	IR, SM
84	Xanthorrhizol	1753	nd	0,5	nd	IR, SM
85	14-Hydroxy- α -muuroloène	1772	nd	5,2	nd	IR, SM
86	Hexahydrofarnesylacetone	1845	nd	nd	1,4	IR, SM
87	(<i>E</i>)-Acétate de nuciferyl	1879	nd	nd	1,5	IR, SM

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

88	kaur-15-ène	1988	nd	nd	1,8	IR, SM
89	Phyllocladène	2013	nd	nd	1,5	IR, SM
90	<i>épi</i> -13-Oxide de manoyl	2011	nd	nd	28,6	IR, SM
91	Kaur-16-ène	2040	nd	nd	8,1	IR, SM
Taux d'identification (%)			99,6	93,4	90,3	
Rendements (%)			0,08	0,02	0,003	
Monoterpènes hydrocarbonés			25,6	0,0	0,0	
Monoterpènes oxygénés			27,5	0,0	3,6	
Sesquiterpènes hydrocarbonés			12,6	48,6	3,7	
Sesquiterpènes oxygénés			30,0	44,8	2,4	
Diterpènes hydrocarbonés			0,0	0,0	11,4	
Diterpènes oxygénés			0,0	0,0	28,6	
Apocarotènes			0,0	0,0	16,7	
Dérivés non-terpéniques			3,9	0,0	23,9	

Les composés majoritaires sont indiqués en gras. ^a Ordre d'élution est donné sur une colonne capillaire DB-5. ^b Les indices de rétention (IR) sont déterminés relativement aux temps de rétention d'une série de *n*-alcanes. ^c Pourcentage relatif calculé par CG/ FID sur une colonne capillaire apolaire DB-5. ^d nd : non déterminé. ^e IR (Indices de Rétention) et SM (Spectre de Masse).

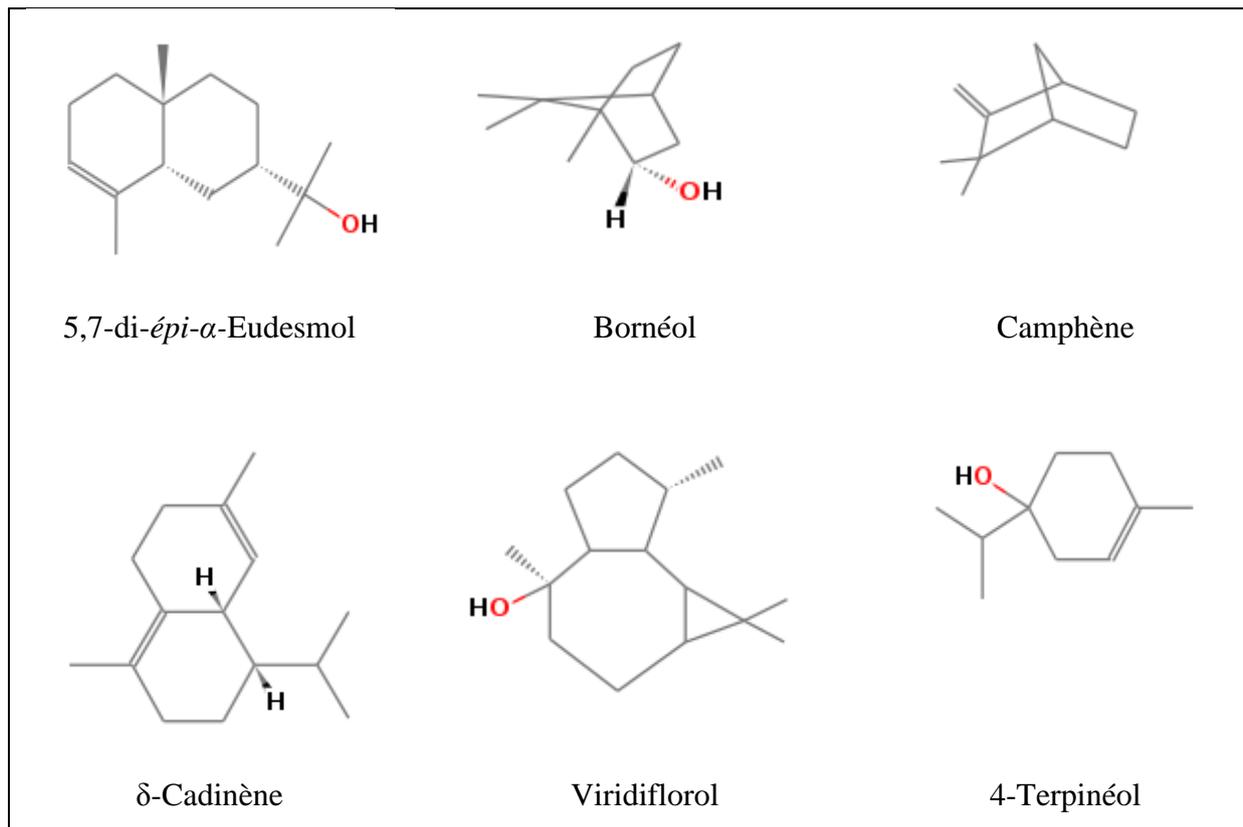


Fig.25 : Composés majoritaires caractérisés dans les huiles essentielles de *C. ladaniferus*

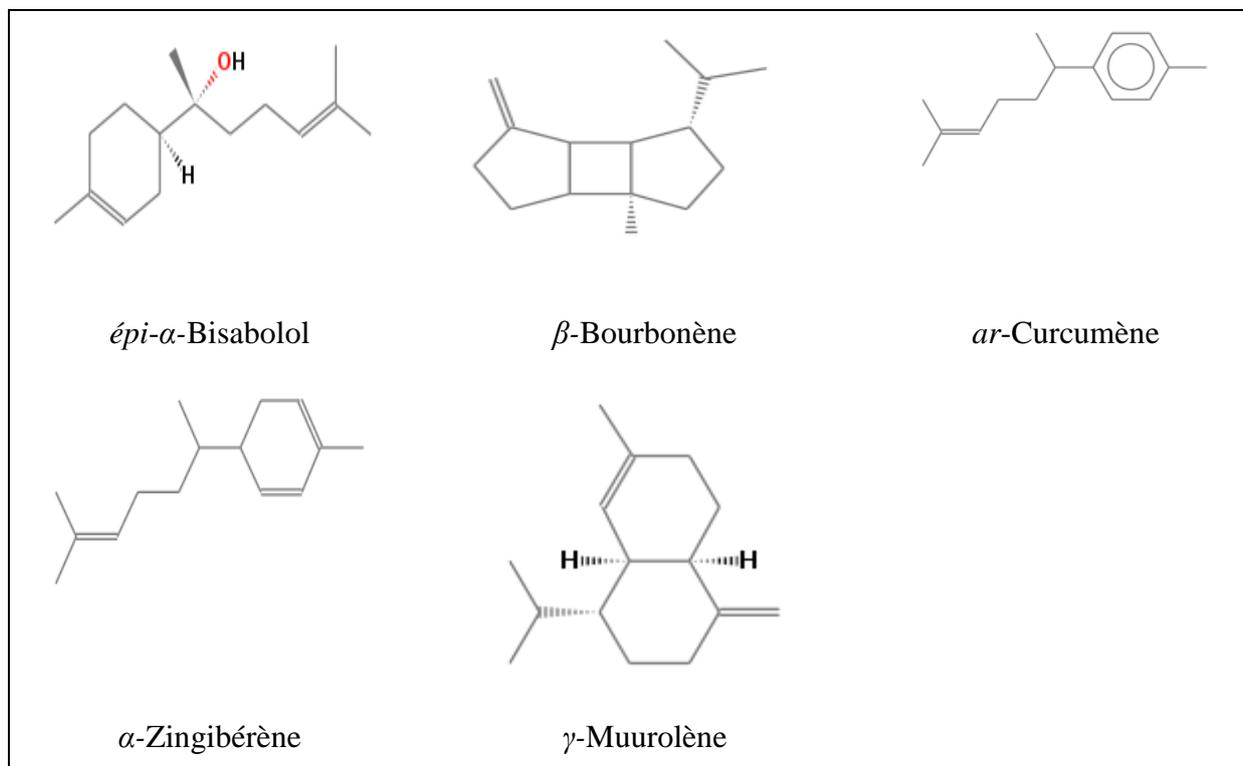


Fig. 26: Composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *C. albidus*

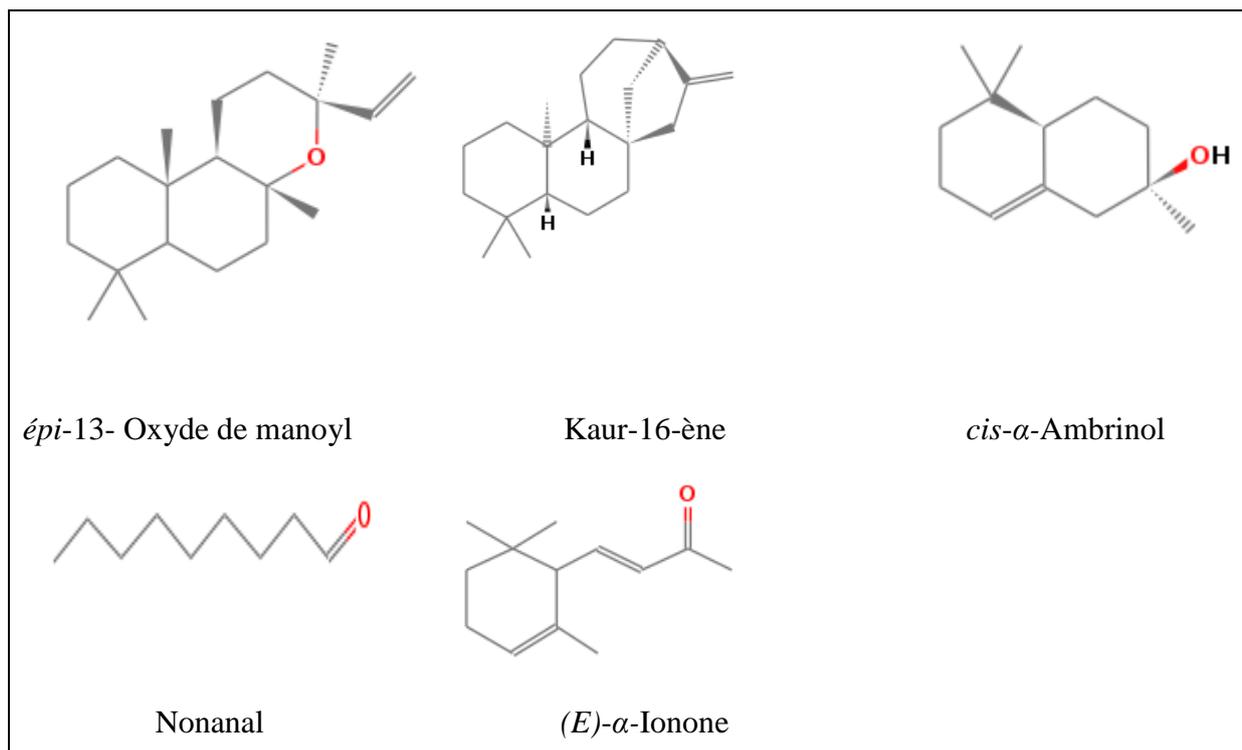


Fig.27 : Composés majoritaires identifiés dans les huiles essentielles de *C. monspeliensis*

Les structures chimiques des composés prédominants ont été sélectionnées du Web Book de Chimie NIST (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>).

IV.1.4. Travaux antérieurs sur la composition chimique des huiles essentielles

Comme c'est déjà indiqué dans le chapitre II, les cistes sont des plantes vivaces caractéristiques de la région méditerranéenne. L'abondance de ces plantes ainsi que leurs utilisations en médecine traditionnelle par les populations de ces pays, a poussé plusieurs chercheurs à les étudier pour les valoriser à des fins thérapeutiques, industriel, etc.

- *C. ladaniferus* L.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *C. ladaniferus* L.(sous-espèces incluses) [3-12]. L'étude comparative du profil chimique des huiles essentielles obtenues de la partie aérienne de *C.ladaniferus* poussant en Algérie, avec ceux des travaux réalisés, montre des différences à la fois qualitatives et quantitatives. En effet, les monoterpènes hydrocarbonés prédominent dans la plus part des études avec des proportions élevées de l'α-pinène. Les valeurs varient de 39% à 47,1% [3-5]. D'autre part, le viridiflorol a été aussi identifié comme produit principal par plusieurs auteurs. Dans les huiles essentielles des feuilles de ciste poussant au Maroc, ce sesquiterpène oxygéné

a atteint un pourcentage entre 16,4% et 19,46% dans deux travaux [6-7]. Toute fois, en Portugal et en Espagne, le pourcentage est parvenu à 15,1% et 13,59 % respectivement [8-9]. Par ailleurs, les huiles essentielles de la plante cultivée en France sont caractérisées par un pourcentage de 11,8% en viridiflorol [3].

Le bornéol (un monoterpène oxygéné) est moins présent dans les huiles essentielles provenant des feuilles du ciste d'Espagne (4,4%) [10], mais il se trouve à (11,1%) des huiles extraites des feuilles de ciste du Maroc [11]. Ce pourcentage est proche de celui de nos huiles essentielles (12,5%).

Le camphène, un autre composé monoterpénique est aussi présent dans des pourcentages similaires dans les extraits aromatiques du ciste du Maroc et de l'Allemagne (12,1%), (12,2%) et (15,5%) [4, 6, 11].

Les terpénoïdes (*trans*-pinocarvéol et camphor) sont caractérisés à (19,46%) et (20%) du pourcentage totale des huiles essentielles dans deux travaux en Espagne [9-10].

- ***Cistus albidus* L.**

Très peu d'études ont évalués la composition chimique des huiles essentielles de *C.albidus*. Ces travaux ont traités différentes parties de l'espèce en question (feuilles, partie aérienne) par les techniques d'extraction à savoir l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur.

L'examen du profil chimique des huiles essentielles des feuilles du ciste d'Espagne montre la prédominance totale des sesquiterpènes hydrocarbonés avec α -zingibérène et *ar*-curcumene composés majoritaires à (20,7%) et (13,2%) respectivement [12], ces derniers ont été typiquement identifiés dans la composition des huiles essentielles du ciste de France avec des pourcentages qui diffèrent (12,7%) et (7,7%) [13].

La composition des huiles essentielles obtenues à partir de la partie aérienne de *C. albidus* poussant en Algérie est différente de celle décrite en haut. En effet, le pourcentage des sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés est presque identiques : (48,6%) et (44,8%) respectivement (Tableau 05). *Epi*- α -bisabolol (11,4%) et β -bourbonène (8,7%) sont les composants prépondérants parmi les sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés identifiés dans nos huiles essentielles.

- ***Cistus monspeliensis* L.**

Il est à noter aussi que des études sur la composition chimique des huiles essentielles de *C. monspeliensis* poussant dans différentes régions du bassin méditerranéen, ont été trouvées dans la littérature avec des résultats variés.

A première vue, nous avons noté une similitude entre les composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles de ciste poussant en Grèce avec ceux de nos huiles mais avec des pourcentages différents [14]. Effectivement, Les diterpènes oxygénés et hydrocarbonés (oxyde 13-*épi*-manoyle et kaur-16-ène) ont été identifiés à des pourcentages plus élevés que ceux des nôtres (39,69%, 18,51%) respectivement. De plus, le sesquiterpène oxygéné (oxyde de caryophyllène) se trouve à 8,50%, ce dernier n'a pas été identifié dans la composition de nos huiles essentielles.

Au Maroc, l'oxyde 13-*épi*-manoyle est caractérisant des huiles essentielles obtenues des feuilles de ciste par entraînement à la vapeur (7,7%) [15]. Par ailleurs, Le profil chimique des huiles essentielles est totalement différent dans une autre étude. Réellement, Nous avons noté la présence d'un composé monoterpénique qui est l' α -Pinène (5,6%) et la présence d'un aldéhyde, le nonanal (3,9%), les apocarotènes, quand à eux sont moins présents (7,8%) [7].

La formule chimique des huiles essentielles est dominée par la présence de l'oxyde 13-*épi*-manoyle (17,7%), Bornéol (6,3%), Kaur-16-ène (3,6%) dans un travail fait par Loizzo et collaborateurs [16]. A l'opposé, le bornéol est moins abondant dans la composition totale des huiles essentielles de *C.monspeliensis* de l'Algérie (0,9%).

En conclusion, l'étude de la composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *C.ladaniferus*, *C.albidus* et *C.monspeliensis* poussant en Algérie a montré des dissemblances remarquables. De plus, les travaux antérieurs accomplis sur les huiles essentielles de ces espèces ont dévoilé des différences qualitatives et quantitatives. Cette différence peut être attribuée à plusieurs facteurs tels que l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte, la température, la durée de séchage et la méthode d'extraction [17].

IV.2 Etude de l'activité biologique des huiles essentielles

IV.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

IV.2.1.1. Introduction

Les huiles essentielles et leurs composants sont réputés d'avoir des activités antioxydantes et pourraient agir comme agents de conservation alimentaire. L'emploi des huiles essentielles s'avère être un choix adéquat pour réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques comme le BHT ou le BHA suspectés d'avoir des effets carcinogènes [17].

Dans la présente étude, nous avons cherché la présence d'une éventuelle activité antioxydante des huiles essentielles des cistes par la méthode la plus utilisée qui est la DPPH

puis nous avons complété notre étude par deux autres techniques à savoir le test FRAP et le test β -carotène, dans le but d'une analyse profonde du potentiel antioxydant de ces espèces.

IV.2.1.2 Test du piégeage du radical libre DPPH

Lorsqu'on effectue la réaction entre la solution de DPPH et les différentes concentrations d'huiles essentielles et de vit C (contrôle positif), l'absorbance du mélange diminue au cours du temps de la réaction (1h). La couleur de la solution vire du violet au jaune indiquant une diminution du radical libre DPPH•, qui est transformé en une molécule stable DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (figure 28).

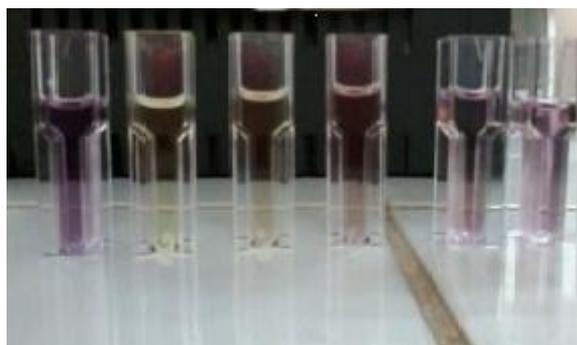


Fig. 28 : Influence de la concentration sur l'intensité de la couleur

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• pour chaque concentration d'huile essentielle et Vit C est indiqué dans les Figures ci-dessous.

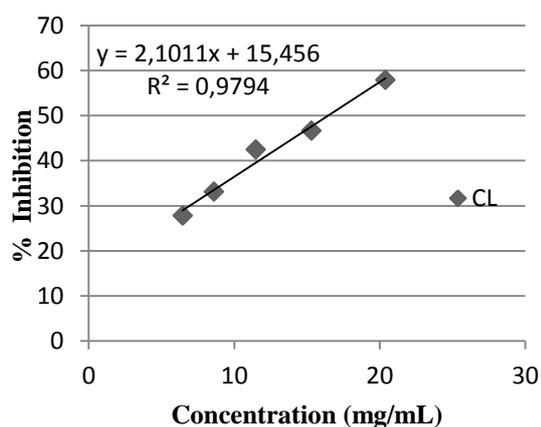


Fig. 29 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*) en fonction des concentrations.

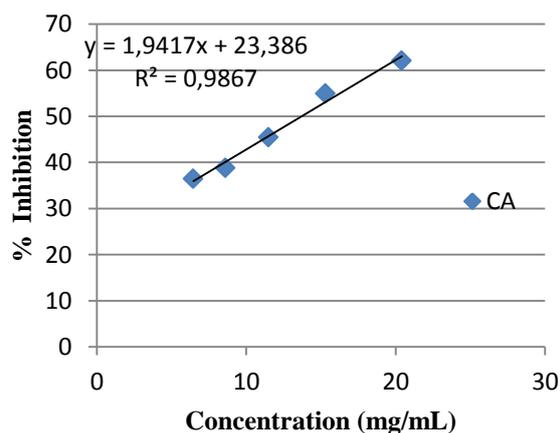


Fig.30 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CA (*C. albidus*) en fonction des concentrations.

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

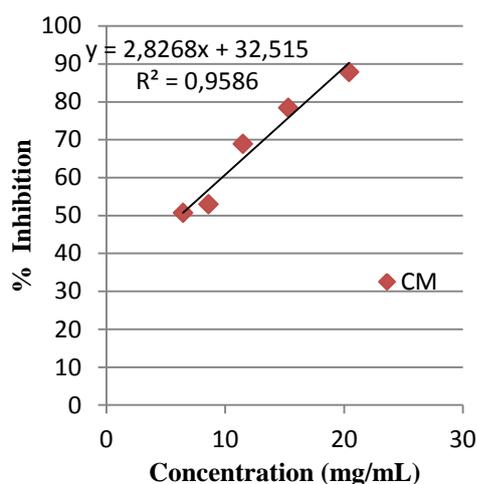


Fig. 31 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CM (*C. monspeliensis*) en fonction des concentrations.

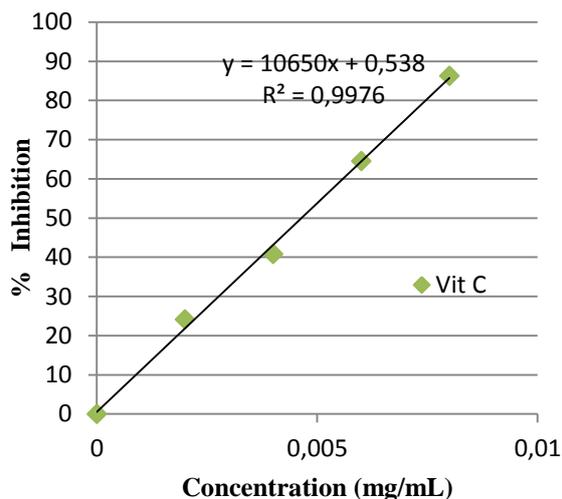


Fig.32 : Variation du pourcentage d'inhibition de la Vit C (acide ascorbique) en fonction des concentrations.

L'activité antioxydante des huiles essentielles (exprimée en CI_{50}) par le test DPPH est indiquée dans le tableau suivant :

Tableau 06. Activité antioxydante des huiles essentielles exprimée en CI_{50}

Extrait	Activité antioxydante					
HEs (CL)	Concentrations (mg/mL)	6,45	8,6	11,47	15,3	20,4
	% Inhibition	27,79	33,15	42,51	46,36	57,93
	CI_{50} (mg/mL)					
HEs (CA)	Concentrations (mg/mL)	6,45	8,6	11,47	15,3	20,4
	% Inhibition	36,46	38,81	45,49	54,94	62,1
	CI_{50} (mg/mL)					
HEs CM)	Concentrations (mg/mL)	6,45	8,6	11,47	15,3	20,4
	% Inhibition	50,66	52,93	68,86	78,37	87,86
	CI_{50} (mg/mL)					
Vit C	Concentrations (mg/mL)	0,002	0,004	0,006	0,008	
	% Inhibition	24,02	40,8	64,53	86,27	
	CI_{50} (mg/mL)					

HEs : Huiles Essentielles ; CL : *C.ladaniferus* ; CA : *C.albidus* ; CM : *C.monspeliensis* ;

Vit C : Vitamine C.

IV.2.1.3 Test de réduction du fer (FRAP)

La réduction du Fe(III) présent dans le complexe tripyridyltriazine ferrique ($\text{Fe}^{\text{III}} - \text{TPTZ}$) en tripyridyltriazine ferreux ($\text{Fe}^{\text{II}} - \text{TPTZ}$), par un antioxydant est caractérisée par un virement de couleur de la solution du jaune au vert. L'intensité de la couleur est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Figure 33). Les valeurs d'absorbance obtenues ont permis de tracer la courbe de la (Figure 34).

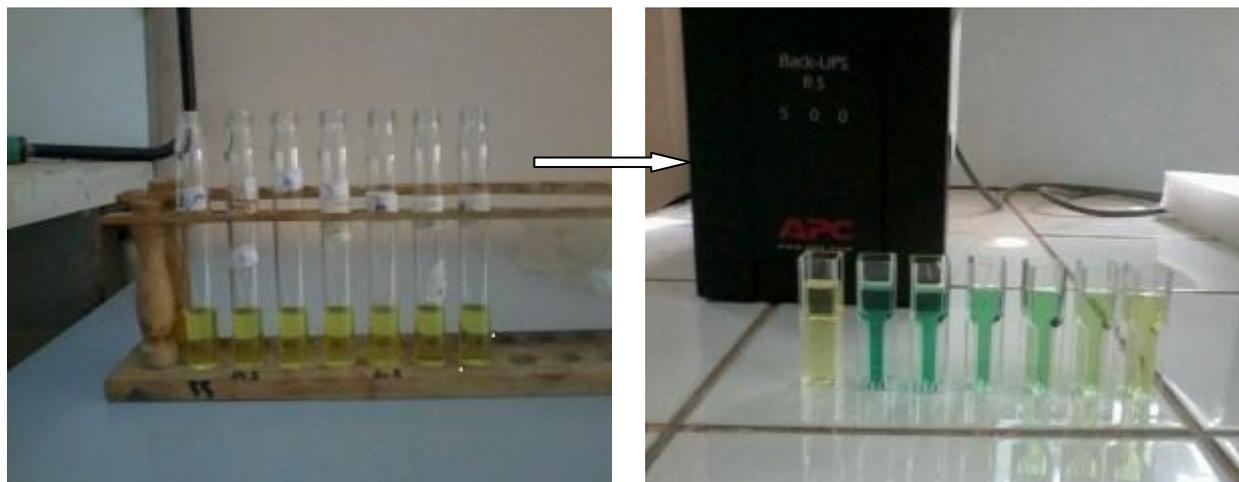


Fig. 33 : Mesure de l'absorbance des solutions d'huiles essentielles par le test FRAP

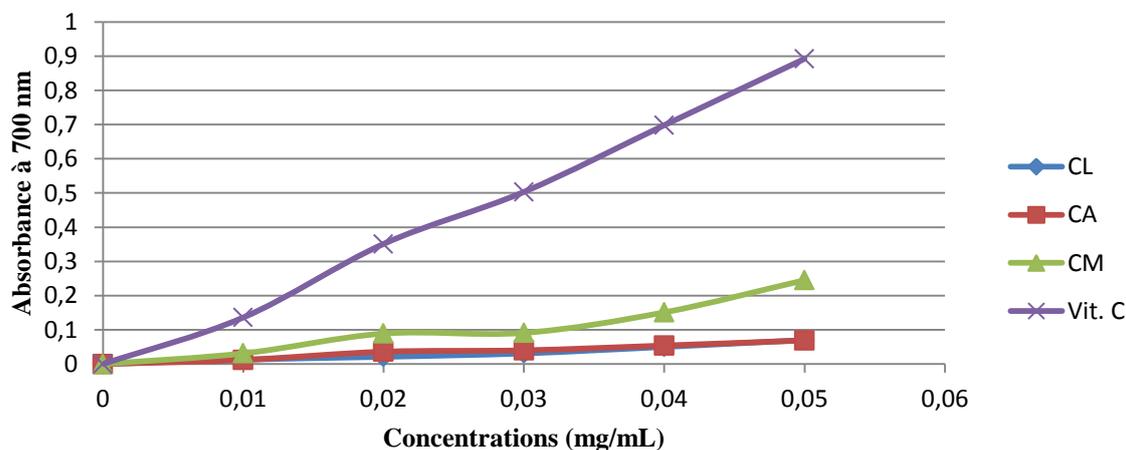


Fig.34 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*), CA (*C. albidus*) et CM (*C. monspeliensis*) ; Vit C (Vitamine C).

IV.2.1.4 Test de décoloration du β -carotène

L'activité antioxydante des huiles essentielles ainsi que l'antioxydant de référence (BHT) a été estimée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

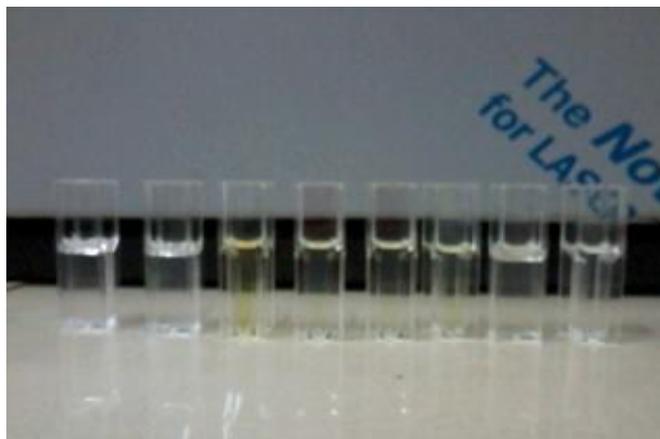


Fig.35 : Mesure de l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène

Le pourcentage d'inhibition des huiles essentielles ainsi que l'antioxydant synthétique sont présentés dans les Figures (36, 37, 38, 39).

Les concentrations qui inhibent 50% de l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène (CI_{50}) sont calculées graphiquement et sont indiquées dans le tableau 07.

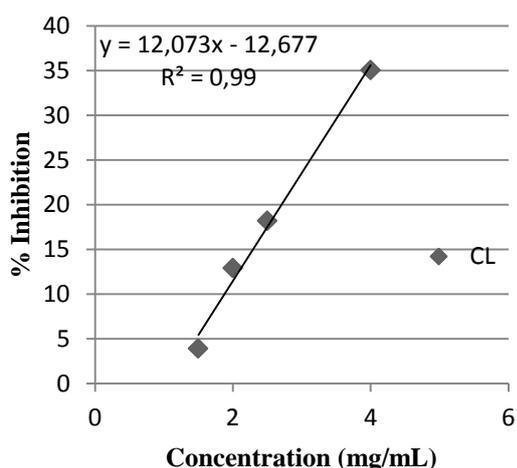


Fig. 36 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*) en fonction des concentrations

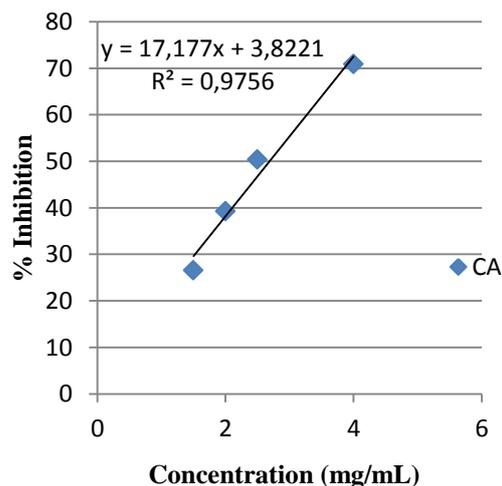


Fig.37 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CA (*C. albidus*) en fonction des concentrations

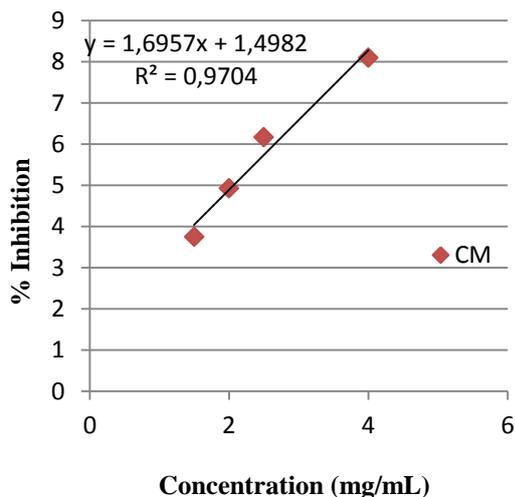


Fig. 38 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CM (*C. monspeliensis*) en fonction des concentrations.

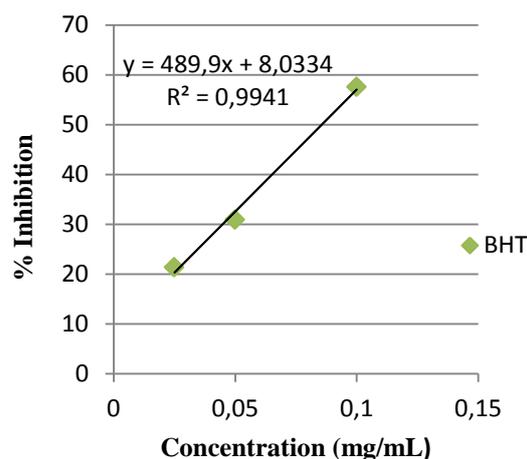


Fig. 39: Variation du pourcentage d'inhibition du BHT en fonction des concentrations.

L'activité antioxydante des huiles essentielles exprimée en CI_{50} est indiquée dans le tableau suivant :

Tableau 07. Activité antioxydante des huiles essentielles de *C. ladaniferus*, *C. albidus*, *C. monspeliensis* et BHT exprimée en CI_{50} .

Extrait		Activité antioxydante			
HEs (CL)	Concentrations (mg/mL)	1,5	2	2,5	4
	% Inhibition	3,89	12,89	18,18	35,06
	CI_{50} (mg/mL)	5,19			
HEs (CA)	Concentrations (mg/mL)	1,5	2	2,5	4
	% Inhibition	26,58	39,24	50,36	70,88
	CI_{50} (mg/mL)	2,69			
HEs (CM)	Concentrations (mg/mL)	1,5	2	2,5	4
	% Inhibition	3,75	4,93	6,17	8,1
	CI_{50} (mg/mL)	28,61			
BHT	Concentrations (mg/mL)	0,025	0,05	0,1	
	% Inhibition	21,36	30,89	57,56	
	CI_{50} (mg/mL)	0,085			

HEs : Huiles Essentielles ; CL(*C.ladaniferus*) ; CA (*C.albidus*) ; CM (*C.monspeliensis*) ; BHT (Hydroxytoluène butylé).

Discussion

- **Test DPPH**

Les données du (Tableau 06) montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec la concentration soit pour les huiles essentielles des différents cistes ou pour la Vit C, de plus le pourcentage d'inhibition des huiles essentielles est inférieur à celui de la Vit C pour toutes les concentrations utilisées. D'autre part, les pourcentages d'inhibitions varient d'une espèce à une autre, une inhibition de 87,86% a été enregistrée pour les huiles essentielles de *C.monspeliensis* pour une concentration de 20,4 mg/mL contre des inhibitions de 57,93% et 62,1% pour les huiles essentielles de *C. ladaniferus* et *C. albidus* respectivement à la même concentration. Cependant à des concentrations inférieures à 15,3 mg/mL, les valeurs du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de *C.ladaniferus* et *C.albidus* se rapprochent.

L'CI₅₀ exprime la quantité d'antioxydant requise à la diminution de la concentration du radical libre DPPH•. À l'inverse du pourcentage d'inhibition, l'activité antioxydante d'un composé est plus grande quand la valeur d'CI₅₀ est la plus basse.

Les valeurs d'CI₅₀ (calculées graphiquement) des huiles essentielles et de la Vit C sont présentées dans le (Tableau 06). Il apparaît d'après les résultats de ce test que les huiles essentielles de *C. monspeliensis* présentent une activité antioxydante plus intéressante par rapport à ceux des autres cistes, effectivement : *C. monspeliensis* (CI₅₀=6,18 mg/mL) > *C. alidus* (CI₅₀=13,71mg/m) > *C. ladaniferus* (CI₅₀= 16,44 mg/mL). Nous en déduisons que les huiles essentielles de *C. monspeliensis* sont plus capables de piéger les radicaux libres DPPH• que les huiles essentielles de *C. albidus* (récoltées en période de floraison dans la même région). De même pour les huiles essentielles de *C.ladaniferus*, qui ont signalé une très faible activité antioxydante. En contre partie, la Vit C montre qu'elle est l'antioxydant le plus efficace capable de ramener le radical libre diphénylpicrylhydrazyl au diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune avec une CI₅₀ remarquable de 0,0046 mg/mL.

D'autres études se sont penchées sur l'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles des cistes, en effet l'évaluation de la capacité antioxydante des volatils des feuilles de *C. ladaniferus* poussant en Portugal par la méthode DPPH, a donné des résultats révélant une inhibition de (86,88± 0,76 % à 153,60 mg/mL) par rapport aux antioxydants synthétiques BHA (96% à 3,6mg/mL) et α -tocophérol (95% à 8,6 mg/mL). La CI₅₀ des huiles essentielles est de (36,28 ± 0,36 mg /mL) [18].

Ces résultats ne sont pas compatibles avec ceux des huiles essentielles de *C.ladaniferus* poussant en Algérie, nos huiles essentielles indiquent une meilleure activité

DPPH. La Vit C qui a été utilisée dans notre étude, s'est révélée plus active que le BHA ou l' α -tocophérol. Néanmoins, l'extrait phénolique pour la même étude indique une forte capacité antioxydante ($95,96 \pm 0,14\%$ à $0,31\text{mg/mL}$) par rapport aux huiles essentielles et même aux antioxydants synthétiques. La composition chimique des huiles essentielles n'a pas été décrite par les auteurs [18].

L'étude de Loizzo et collaborateurs [16], portant sur l'étude chimique et biologique de plusieurs cistes parmi eux *C. monspeliensis*, a montré un pouvoir antioxydant élevé des volatils (extraites des feuilles) par rapport à nos huiles essentielles par la même méthode ($CI_{50}=991,9 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$) ; ($CI_{50}= 5\mu\text{g/mL}$ pour la Vit C).

- **Test FRAP**

La courbe (Figure 34) indique que le pouvoir réducteur des huiles essentielles de *C. monspeliensis* et de l'antioxydant de référence augmente avec la concentration. Une grande absorbance indique un pouvoir réducteur élevé. On n'en conclut que la vitamine C est la plus active (une absorbance de 0,892 pour une concentration de 0,05 mg/mL).

Des valeurs d'absorbance faibles et semblables ont été enregistrées pour les huiles essentielles de *C. ladaniferus* et *C. albidus* à des concentrations allant de 0,01 à 0,05 mg/mL indiquant une faible capacité à réduire le Fe (III) dans cette zone par rapport à l'antioxydant de référence.

Les espèces de cistes ont fait objet de quelques études par le test FRAP. L'étude de Guimarães et collaborateurs [18], par la méthode FRAP de la fraction phénolique et des huiles essentielles des feuilles de *C. ladaniferus* du Portugal, a montré que la valeur de l'absorbance de la fraction phénolique est supérieure à celle des huiles essentielles. La meilleure activité réductrice des huiles essentielles correspond à une absorbance de ($0,60 \pm 0,00$) pour une concentration de 4,80 mg/mL. Les huiles essentielles se sont montrées plus active que l' α -tocophérol et le BHA (antioxydants de référence). Les valeurs de l'absorbance sont estimées à 0,13 pour une concentration de 8,6 mg/mL pour le BHA et 0,12 pour une concentration de 3,6 mg/mL pour l' α -tocophérol. L'activité antioxydante de nos extraits volatils a montré une meilleure activité par rapport à ceux de *C. ladaniferus* du Portugal. La Vit C employée dans notre étude semble plus « puissante » que le BHA et l' α -tocophérol. Rappelons aussi que la composition chimique des huiles essentielles n'a pas été présentée par les auteurs.

Nicoletti et collaborateurs [19], ont étudié le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques de divers cistes. La composition chimique est caractérisée par la présence des polyphénols (flavonoïdes et tannins). L'activité réductrice de l'extrait de *C. ladaniferus* par le test FRAP

(estimée en CI_{50}) est de $(142 \pm 12,46 \mu\text{g/mL})$, n'empêche que la Vit C exhibe la meilleure activité antioxydante $(40 \pm 1,31 \mu\text{g/mL})$.

- **Test β -carotène**

Les résultats du (Tableau 07) révèlent que le pourcentage d'inhibition des radicaux libres par les différents extraits testés augmente avec la concentration, bien que cette augmentation ne soit pas significative pour les concentrations d'huiles essentielles de *C. monspeliensis*. En effet, à une concentration de 4 mg/mL, un pourcentage d'inhibition faible de 8,1% a été évalué. Parallèlement pour la même concentration, des valeurs de 35,06% et 70,88% d'inhibition sont accordées aux huiles de *C. ladaniferus* et *C. albidus* respectivement. Les huiles essentielles de *C. albidus* et le BHT à différentes concentrations inhibent d'une manière révélatrice les radicaux libres, mais la meilleure activité antioxydante est accordée à l'antioxydant de référence, une inhibition de 57,56% a été enregistrée pour une concentration de 0,1 mg/mL.

Les CI_{50} calculées expriment les concentrations des extraits capables de réduire 50% des radicaux peroxydes. Plus la valeur de la CI_{50} est faible, plus le pouvoir antioxydant est grand. L'activité antioxydante de la décoloration du β -carotène par les huiles essentielles testées est classée comme suit : BHT ($CI_{50} = 0,085 \text{ mg/mL}$) > *C. albidus* ($CI_{50} = 2,69 \text{ mg/mL}$) > *C. ladaniferus* ($CI_{50} = 5,19 \text{ mg/mL}$) > *C. monspeliensis* ($CI_{50} = 28,61 \text{ mg/mL}$). On en déduit que l'effet antioxydant des huiles essentielles de *C. monspeliensis* est relativement faible par rapport aux autres huiles et au BHT.

Le test du blanchissement de la β -carotène a donné une meilleure contribution des huiles essentielles des feuilles de *C. ladaniferus* poussant en Portugal par rapport à nos huiles ($66,32 \pm 1,39\%$ à $0,6 \text{ mg/mL}$), ($CI_{50} = 0,12 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$) et par rapport à l'antioxydant synthétique TBHQ ($82,2 \pm 2 \text{ mg} \%$ à 2 mg/mL) [18].

Une étude tunisienne sur les huiles essentielles des feuilles de *C. monspeliensis* par le test β -carotène indique une meilleure activité inhibitrice des radicaux libres par rapport à nos huiles. Réellement, les valeurs des CI_{50} des huiles essentielles ainsi que l'antioxydant de référence (galatte de propyle) sont : ($CI_{50} = 54,7 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$) ; ($CI_{50} = 1,0 \pm 0,041 \mu\text{g/mL}$) respectivement [16].

Les résultats de la peroxydation lipidique (exprimée par la décoloration de la β -carotène) de l'extrait méthanolique des feuilles de *C. monspeliensis*, *C. libanotis* et *C. villosus* de France, montrent une activité suprême des extraits de ces cistes par rapport à nos huiles essentielles : *C. monspeliensis* ($CI_{50} = 20,2 \pm 5,54 \mu\text{g/mL}$) > *C. libanotis* ($CI_{50} = 72,0 \pm 5,53 \mu\text{g/mL}$) > *C.*

villosus ($CI_{50} = 214,0 \pm 2,61 \mu\text{g/mL}$). Les huiles essentielles de *C. monspeliensis* et *C. libanotis* se sont révélées plus actives que le BHT pris comme référence dans cette étude ($CI_{50} = 85,0 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$) [19].

A la lumière des différents résultats obtenus par les méthodes conventionnelles de l'évaluation de l'activité antioxydante, il en résulte que l'activité antioxydante des huiles essentielles testées est liée à la composition chimique, probablement aux composés majoritaires. Généralement, les composés oxygénés présentent une activité antioxydante plus remarquable que les terpènes hydrocarbonés [20]. En effet, la composition chimique des huiles essentielles de *C. monspeliensis* poussant en Algérie est caractérisée par une absence totale des monoterpènes hydrocarbonés ce qui peut expliquer leur bonne activité antioxydante DPPH.

L'assistance des alcools monoterpéniques (4-terpinéol à 5,7% de la composition des huiles essentielles de *C. ladaniferus*) et des dérivés non terpéniques (nonanal à 5,4% de la composition chimique des huiles essentielles de *C. monspeliensis*) semble contribuer à l'activité antioxydante de nos deux huiles. D'après l'étude d'Edris [21], les alcools terpéniques, les cétones, les éthers et les aldéhydes accentuent l'activité antioxydante de quelques huiles essentielles. Cependant, l'activité des huiles essentielles peut dépendre de l'effet de synergie entre toutes les molécules ou seulement entre les molécules majoritaires qui peuvent être contrôlées par les composés minoritaires [22].

L'étude de Miguel [23] sur l'activité antioxydante DPPH des huiles essentielles de quelques plantes, indique une bonne capacité antioxydante des huiles essentielles contenant des composés phénoliques tels que le carvacrol, le thymol, etc. Ce résultat peut expliquer la bonne activité antioxydante des huiles essentielles de *C. monspeliensis* poussant en Tunisie par rapport à nos huiles [16]. La fraction phénolique (carvacrol et eugénol) est évaluée à 9,8% tandis que le pourcentage du carvacrol dans nos huiles essentielles est estimé seulement à 0,9%.

Toutefois, les résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles des trois espèces de cistes montrent un comportement différent des huiles de *C. monspeliensis* comme piègeur des radicaux libres DPPH• et comme inhibiteur de la peroxydation lipidique. D'après Bruni et collaborateurs [24], en raison de la présence d'une émulsion, les molécules polaires peuvent être « moins efficaces » pour prévenir l'oxydation de l'acide linoléique. Cela suggère que les composés polaires pourraient être responsables de l'activité antioxydante révélée par

le test DPPH. Par ailleurs toutes les huiles essentielles des espèces de cistes étudiées sont moins actives que la Vit C ou le BHT.

En Conclusion, Les résultats des tests de l'activité antioxydante *in vitro* montrent que les huiles essentielles des trois espèces de cistes peuvent être une source naturelle d'antioxydants à exploiter dans l'industrie alimentaire.

IV.2.2 Mesure de l'activité antimicrobienne

IV.2.2.1 Introduction

Les résultats préliminaires de l'activité antioxydante des huiles essentielles, nous en poussé à vérifier l'activité thérapeutique antimicrobienne des huiles essentielles de la partie aérienne de *C.ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis* de l'Algérie. Pour cela, nous avons employé deux méthodes, celle de la diffusion sur milieu gélosé et celle de dilution.

IV.2.2.2 Méthode de diffusion sur disque

Nous avons choisis pour cette étude six bactéries à Gram-positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Micrococcus luteus* ATCC9341) et cinq bactéries à Gram-négatif (*Klebsiella-pneumoniae* ATCC 700603, *Escherchia coli* ATCC 25912, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et deux levures (*Candida albican* ATCC 10231 et *Candida albican* ATCC 26790).

Le choix des souches de l'étude dépend du but spécifique de la recherche. Les souches de références sensibles aux antibiotiques sont de préférence employées. Le test devrait au moins se composer d'une bactérie à Gram positif et d'une bactérie à Gram négatif [25]. Ces mêmes souches ont servi comme modèle de référence dans plusieurs études d'évaluation de l'activité antibactérienne de nombreux produits naturels et de synthèse [26-27].

L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des trois cistes sur toutes les souches microbiennes a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose (Figure 40). Les diamètres d'inhibition sont présentés dans les Tableaux (08, 09, 10).

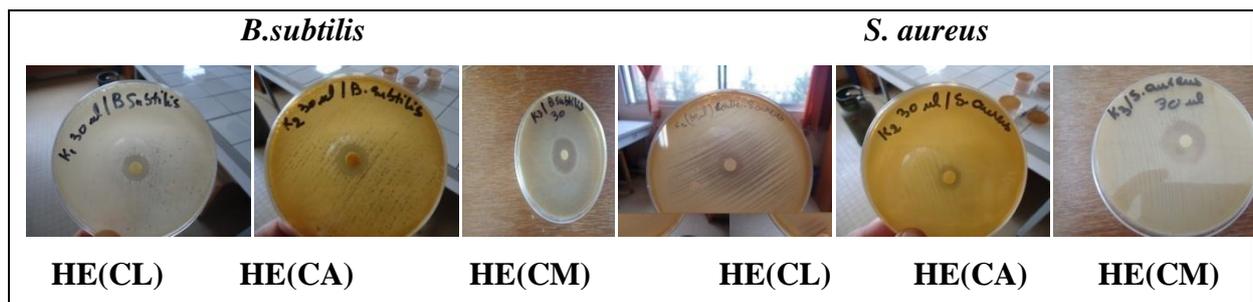


Fig.40 : Méthode de diffusion sur disque (zone d'inhibition de la croissance de quelques souches bactérienne. (HE : Huile Essentielle ; CL : *C. ladaniferus* ; CA : *C. albidus* ; CM : *C. monspeliensis*) (Source : Bechlaghem karima)

Discussion

Les résultats du test préalable de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque montrent que les huiles essentielles de *C. ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis* présentent des activités vis-à-vis de *B. subtilis*, *S. aureus*, *B. cereus* et *M. luteus* (Tableaux 08,09, 10). Pour les autres bactéries, l'activité divergent. En fait, en augmentant la charge des disques, l'effet des huiles essentielles sur les bactéries change ; les souches passent de l'état résistant à l'état sensible (cas des bactéries à Gram négatif) et de l'état sensible à l'état très sensibles voire extrêmement sensible (cas des bactéries à Gram positif).

Les meilleures zones d'inhibition sont attribuées à l'huile de *C. monspeliensis*, elle possède une activité antimicrobienne importante si on la compare avec les activités des deux autres huiles. Elle est active vis-à-vis des bactéries à Gram positif : *B. Subtilis* ($23 \pm 0,28$ mm) et *S. aureus* ($25 \pm 0,28$ mm) et vis-à-vis des bactéries à Gram négatif : *K. pneumoniae* (14 ± 0 mm) et *C. freundii* (15 ± 0 mm) et cela avec une charge de $30 \mu\text{l}$ (Tableau 10).

Les huiles de *C. ladaniferus* et *C. albidus* sont actives vis-à-vis des quatre bactéries à Gram positif (*B. subtilis*, *S. aureus*, *B. cereus* et *M. luteus*) avec des diamètres d'inhibition qui varient entre 12 et 17,33 mm. Ces huiles ont une activité moyenne vis-à-vis de *L. monocytogenes* (des diamètres allant de 8mm à 12mm sont observées) (Tableaux 08,09).

Une faible activité des huiles essentielles de *C. ladaniferus* a été enregistrée vis-à-vis des souches *E. faecalis* ($9 \pm 0,28$ mm à partir de $15 \mu\text{L}$ d'huile), *K. pneumoniae* ($8 \pm 0,57$ mm) et *S. typhimurium* (une seule zone d'inhibition à $13 \pm 0,57$ mm pour $30 \mu\text{L}$ d'huile). Une activité moyenne pour les huiles de *C. albidus* vis-à-vis de *K. pneumoniae* ($10,33 \pm 0,88$ mm), *S. typhimurium* (9 ± 1 mm). Pour les autres souches aucune zone d'inhibition n'a été décelée.

L'antibiogramme (Tableau 11), nous a permis d'une part de vérifier la conformité des souches de références, la validité des manipulations, la technique utilisée et enfin la comparaison des résultats obtenus avec ceux des huiles essentielles. Le choix de ces antibiotiques était basé sur leurs disponibilités dans le commerce ainsi que sur leur utilisation comme référence dans plusieurs travaux récents [28].

Par rapport à l'antibiotique utilisé (la Gentamicine), les différences sont significatives pour l'ensemble des souches. Néanmoins, une similitude dans les résultats avec l'antibiotique a été observée pour les huiles de *C. monspeliensis*. En effet, le diamètre de la zone d'inhibition des huiles pour *S. aureus* est de $(25 \pm 0,28 \text{ mm})$ (charges des disques en huiles entre 25 et 30 μl), diamètre identique à celui de la Gentamicine ($25 \pm 0 \text{ mm}$).

Les huiles de *C. ladaniferus* possèdent le même effet inhibiteur de la croissance bactérienne de *L. monocytogenes*, ($12 \pm 0 \text{ mm}$ et $12 \pm 0,28 \text{ mm}$ pour la charge des disques de 25 μL et 30 μL respectivement) que celle de la Gentamicine ($12 \pm 0 \text{ mm}$).

Les huiles de *C. albidus* sont actives de la « même façon » que la Gentamicine vers la même souche bactérienne *L. monocytogenes* ($11,66 \pm 0,33 \text{ mm}$ pour une charge de disque à partir de 15 μL).

La seule activité contre les levures utilisées dans cette étude, a été décelée avec les huiles essentielles de *C. albidus* vis-à-vis les *C. albicans* ATCC 10231. La comparaison est faite avec l'Amphotéricine, la différence est très significative quelque soit la charge du disque. Ce comportement est probablement dû au potentiel multirésistant de la souche de levure utilisée.

IV.2.2.3 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Dans un premier temps, les tests de l'activité antimicrobienne ont été réalisés vis-à-vis toutes les souches. Les produits qui semblent être actifs révélés par l'apparition de zones d'inhibitions, ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité par la méthode des dilutions pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI). L'estimation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles des trois cistes sont regroupés dans les Tableaux (08, 09, 10).

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Tableau 08 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. ladaniferus*

Microorganismes	Huiles essentielles de <i>C. ladaniferus</i>						
	Charge des disques (µL)						^a CMI (µg/mL)
	5	10	15	20	25	30	
Diamètre d'inhibition (mm)							
Gram-positif							
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	11±0,57	14±0	14±0,288	15±0,28	15±0	15±0	10±0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12±0,28	12±0,28	12±0,28	12±0,28	12±0	12±0	20±0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	8±0,28	8±0,28	9±0,28	10±0,28	12±0,28	12±0	20±0
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	^b -	-	9±0,28	10±0,28	12±0,28	12±0,28	20±0
<i>B.cereus</i> ATCC 10876	14,33±0,33	14,33±0,33	14,33±0,33	15±0	15±0	15±0	11±0
<i>M. luteus</i> ATCC9341	15±0,57	15±0	15±0	15±0,57	15±0,57	15±0,57	18±0
Gram- négatif							
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	-	-	8±0,57	-
<i>E. coli</i> ATCC 25912	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	-	-	-	-	-	13±057	20±0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-
Levures							
<i>C. albican</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.albiacn</i> ATCC 26790	-	-	-	-	-	-	-

^a CMI: Concentration Minimale Inhibitrice exprimée en µg/mL ; ^b - : aucune zone d'inhibition ; ATCC : American Type Culture Collection ; Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SD (n=3) en utilisant le programme Past 3.03

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Tableau 09 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. albidus*

Microorganismes	Huiles essentielles de <i>C. albidus</i>						^a CMI($\mu\text{g/mL}$)
	Charge des disques (μL)						
	5	10	15	20	25	30	
	Diamètre d'inhibition (mm)						
Gram-positif							
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	15 \pm 0	15 \pm 0	15 \pm 0	15 \pm 0	16 \pm 0,28	16 \pm 0,288	20 \pm 0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12 \pm 0,28	12 \pm 0,28	12 \pm 0	12 \pm 0	12 \pm 0	12 \pm 0,28	20 \pm 0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	9 \pm 0,28	11 \pm 0,57	11,66 \pm 0,33	11,66 \pm 0,33	11,66 \pm 0,33	11,66 \pm 0,33	20 \pm 0
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	^b -	-	-	-	-	-	-
<i>B.cereus</i> ATCC 10876	15 \pm 1	16,33 \pm 0,33	19 \pm 0				
<i>M. luteus</i> ATCC9341	17,33 \pm 0,33	17,33 \pm 0,33	17,33 \pm 0,33	17,33 \pm 0,33	17,33 \pm 0,33	17,33 \pm 0,33	17 \pm 0
Gram- négatif							
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	8 \pm 0,57	10,33 \pm 0,88	10,33 \pm 0,88	10,33 \pm 0,88	-
<i>E. coli</i> ATCC 25912	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	-	-	8 \pm 0	8 \pm 0	9 \pm 1	9 \pm 1	19 \pm 0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-
Levures							
<i>C. albican</i> ATCC 10231	8 \pm 0,28	8 \pm 0,28	8 \pm 0,28	8 \pm 0,28	10 \pm 0,28	13 \pm 0,28	20 \pm 0
<i>C.albiacn</i> ATCC 26790	-	-	-	-	-	-	-

^a CMI: Concentration Minimale Inhibitrice exprimée en $\mu\text{g/mL}$. ^b - : aucune zone d'inhibition ; ATCC : American Type Culture Collection ; Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3) en utilisant le programme Past 3.03.

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Tableaux 10 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. monspeliensis*

Microorganismes	Huiles essentielles de <i>C. monspeliensis</i>						^a CMI µg/mL)
	Charge des disques (µL)						
	5	10	15	20	25	30	
	Diamètre d'inhibition (mm)						
Gram-positif							
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	12±0,28	13±0,28	19±0,57	20±0,57	20±0,57	23±0,28	0,25±0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	14±0	15±0	16±0	20±0,28	25±0,28	25±0,28	0,25±0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	^b -	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	-	-	-	-	-	-	-
<i>B.cereus</i> ATCC 10876	17±0	17±0	17±0	17±0	17±0	17±0,57	0,2±0
<i>M. luteus</i> ATCC9341	12±0	14±1,15	14±1,15	14,33±0,88	14,33±0,88	15±0,57	0,2±0
Gram- négatif							
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	8±0,57	10,33±0,88	13±0,57	14±0,57	14±0	14±0	20±0
<i>E. coli</i> ATCC 25912	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	8±0,28	12±0,28	12±0,28	12±0,28	15±0,28	15±0	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	12±1	12±1	12±1	12±1	12±0	12±0	20±0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-
Levures							
<i>C. albican</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.albiacn</i> ATCC 26790	-	-	-	-	-	-	-

^aCMI : Concentration Minimale Inhibitrice exprimée en µg/mL ; ^b- : aucune zone d'inhibition ; ATCC : American Type Culture Collection ; Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SD (n=3) en utilisant le programme Past 3.03

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Tableau 11 : Zones d'inhibition et les CMI des antibiotiques standards

Microorganismes	Antibiotiques			
	Gentamicine (10µg)		Amphotéricine (100µg)	
	^a DI(mm)	^b CMI (µg/mL)	DI (mm)	^b CMI (µg/mL)
Gram -positif				
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	22±0	5,2±0	^c -	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25±0	0,19±0	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	12±0	2,21±0	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 49452	13±0	0,78±0	-	-
<i>B.cereus</i> ATCC 10876	28±0	0,5±0	-	-
<i>M. luteus</i> ATCC9341	28,5±0	0,5±0	-	-
Gram-négatif				
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	15±0	4,16±0	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25912	23±0	0,32±0	-	-
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	32±0	0,19±0	-	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	25±0	0,25±	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	21,33	0,5±0	-	-
Levures				
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	32±0	8±0
<i>C.albicans</i> ATCC 26790	-	-	30±0	4±0

^aDI : Diamètre d'Inhibition ; ^bCMI: Concentration Minimale Inhibitrice exprimée en µg/mL. ^c - : aucune zone d'inhibition ; ATCC : American Type Culture Collection ; Les valeurs sont exprimées en moyenne ±SD (n=3) en utilisant le programme Past 3.03.

Discussion

Les résultats les plus prometteurs sont obtenus à partir de l'huile de *C. monspeliensis* comme le montre le (Tableau 10). En effet, la CMI des huiles est de $0,25 \pm 0$ $\mu\text{g/mL}$ contre la croissance bactérienne de *S. aureus* alors qu'elle est de 20 ± 0 $\mu\text{g/mL}$ pour les huiles de *C. ladaniferus* et *C. albidus* pour la même souche. Ce même résultat a été enregistré pour les huiles de *C. monspeliensis* envers *B. subtilis*. Les valeurs des CMI des trois huiles vis-à-vis les autres souches (*L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *S. typhimurium*) étaient de l'ordre de 20 $\mu\text{g/mL}$. Les souches d'*E. coli* ATCC 25912 ont montré une résistance à nos trois huiles, aucune activité n'a été détecté quel que soit la charge des disques. Notons aussi qu'aucune activité n'a été remarquée contre les levures sauf pour les huiles de *C. albidus*, La valeur de la CMI est estimée à 20 $\mu\text{g/mL}$ tandis qu'elle est de 8 $\mu\text{g/mL}$ pour l'Amphotéricine.

Des travaux antérieurs sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ainsi que les extraits des espèces de cistes ont été publiés, l'espèce *C. ladaniferus* a été la plus explorée. En effet :

L'étude de Rossi et collaborateurs [29], sur les huiles essentielles de *C. ladaniferus* indique une sensibilité des souches bactériennes (*S. aureus* ATCC6538 et *E. coli* ATCC 11775) envers ces huiles. Le diamètre d'inhibition est évalué à 15mm pour une charge de disque de $15\mu\text{L}$ et la CMI est de l'ordre de $0,125\%$ pour le staphylocoque. Les composés majoritaires de l'huile étant l' α -pinène qui est reconnu d'avoir une faible activité inhibitrice contre *S. aureus*. D'après l'auteur, ce monoterpène hydrocarboné n'est pas le seul responsable de cette activité.

L'activité des huiles essentielles extraites des feuilles de *C. ladaniferus* var. *albiflorus* du Maroc ainsi que le labdanum a été testée sur différentes souches bactériennes et fongiques. Les résultats exprimés en degré d'efficacité antimicrobienne, indiquent une forte activité des huiles essentielles contre les bacilles (*B. magaterium*), les staphylocoques (*S. aureus*) et les mucorales (*M. racemosus*) avec des degrés d'efficacité de (2,7 ; 2,0 ; 2,7) respectivement. La résine (labdanum) par contre s'est montrée moins active que les huiles essentielles. La composition chimique des huiles essentielles rassemble les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés représentés exclusivement par le viridiflorol. Quand au labdanum, le profil chimique est composé d'acides gras, phénols et hydrocarbures [30].

Le travail de Mohammedi et Atik [31] portant sur l'étude du potentiel antimicrobien des huiles essentielles obtenues des feuilles de *C. ladaniferus* poussant dans les monts de la région de Tlemcen (Algérie) a révélé une bonne activité contre *L. monocytogenes* ATCC 19111 avec un

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

diamètre d'inhibition (DI=19,5±0,5mm) suivie de *S. aureus* ATCC 601 (DI= 10,66±1,155mm) pour une charge de disque respective de 3µL. La mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été complétée par un autre test. Ce dernier consiste à mesurer à 625 nm, le pourcentage d'inhibition des populations des souches microbiennes par les huiles essentielles. La concentration inhibitrice de 50% des souches microbiennes (CI₅₀) a été évaluée à 1,36 µL/mL.

Les huiles essentielles et les différents extraits (d'hexane, de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle du méthanol et de l'eau) de la partie aérienne de *C.ladaniferus* d'Oulmes du Maroc, ont révélé une forte inhibition des huiles essentielles contre les bactéries à Gram positif (*S. aureus*) et à Gram négatif (*Y. enterocolitica*), *S. aureus* (DI= 27mm, CMI= 250µg/mL) et *Y. enterocolitica* (DI=25mm, CMI= 62,5 µg/mL). Les extraits aqueux et méthanolique ont montré une bonne activité contre les staphylocoques (*S. epidermis* et *S.aureus*). Des diamètres d'inhibitions (DI=23mm et 20mm) ont été mesuré pour l'extrait aqueux et méthanolique respectivement contre *S. epidermis*.

D'autre part, dans la même étude, les extraits obtenus avec le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et l'hexane, ont inhibé la croissance de quelques bactéries avec des zones d'inhibitions respectives de 16 mm, 12 mm et 12 mm pour *S.aureus* et 13mm, 11 mm et 8 mm respectivement pour *Y. enterocolitica* [32].

Boukili et collaborateurs [33] ont évalué l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des feuilles de *C. ladaniferus* var.*maculatus*. Les souches microbiennes pathogènes sont issues d'un milieu hospitalier. Les résultats ont indiqué des activités inhibitrices contre les staphylocoques *S. aureus* (DI= 23 mm ; CMI = 6,25 mg/mL) et *S. epidermidis* (DI=15mm ; CMI= 12,5mg/mL). Les huiles essentielles par contre ont montré une meilleure activité antifongique contre *C.albicans* (DI= 36mm ; CMI=0,001mg/mL). La composition chimique des huiles essentielles est caractérisée par la présence de l'alcool diterpénique (viridiciol 18,16%), du monoterpène hydrocarboné (camphène 17,70%) et du sesquiterpène hydrocarboné (γ -gurjunène 7,15%).

L'activité antimicrobienne des différents extraits (méthanol, éthanol et du mélange acétone/eau) obtenus à partir de la partie aérienne de *C. ladaniferus* L., a été testé sur différentes souches microbiennes de référence. Les souches (*E. coli*, *S. typhimurium* et *C.albicans*) ont montré une résistance envers ces extraits. Par contre, *K .pneumoniae* et *B.cereus* étaient plus susceptibles vers les tout les extraits. Les valeurs des CMI correspondantes étaient entre 0,625 et 1,25mg/mL [34].

Dans un autre travail, les auteurs ont étudiés l'activité antimicrobienne de différents extraits des feuilles de plusieurs espèces de cistes poussant en Turquie, parmi eux *C.monspeliensis*. Les extraits ont été préparés à partir de l'eau, du méthanol, du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et du *n*-butanol. Tous les extraits de *C. monspeliensis* ont montré des activités vers *S. aureus* (ATCC 29213). Les diamètres d'inhibition sont de 9mm à 10 mm. Par contre, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour *P. aeruginosa* (ATCC 27853) et *C. albicans* (ATCC 10231). Une sensibilité vers les autres microorganismes a été observée notamment vers *B.subtilis* (ATCC 6633) pour l'extrait du chloroforme, de l'acétate d'éthyle et de l'eau avec des diamètres d'inhibitions de (10mm, 10mm et 8mm) respectivement [35].

Barraon-Catalan et collaborateurs [36] ont étudié l'effet antibactérien de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *C.ladaniferus* envers *S. aureus* et *E.coli*. La sensibilité des microorganismes envers l'extrait aqueux a été évaluée en CMI₅₀ (Concentration minimale inhibitrice de 50% de la croissance bactérienne). Une bonne activité a été remarqué pour *S. aureus* par rapport à *E. coli* (CMI₅₀= 0,9±0,047 mg/mL et CMI₅₀ = 0,154 ± 0,028 mg/mL) respectivement.

L'extrait phénolique obtenu à partir des feuilles du *C. ladaniferus* a été testé sur quatre souches fongiques : *C. albicans*(ATCC 928), *C. tropicalis* (ATCC 750) , *C. glabrata* (ATCC 2001) et *C. parapsilosis* (ATCC 22019) dans une étude présentée par Barros et collaborateurs [37]. L'extrait a montré un effet inhibiteur puissant contre les levures, les CMI obtenues étaient de à 0,05 mg/mL.

L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des trois cistes poussant en Algérie, a conduit à des résultats qui indiquent que l'huile essentielle de *C. monspeliensis* peut être classée parmi les produits qui ont une forte activité. L'huile inhibe la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 avec un diamètre d'inhibition intéressant qui s'est révélé identique à la Gentamicine (25mm). De plus, le spectre d'action de l'huile est plus large, il s'étend à plusieurs pathogènes. D'autre part, les huiles essentielles de *C. ladanifrus* et de *C. albidus* montrent une activité moyenne vis-à-vis de *S. aureus* (quelque soit la charge du disque) et de *B. subtilis*.

Les bactéries à Gram négatif montrent une résistance plus élevée que les bactéries à Gram positif, cela est dû certainement à la différence structurale des parois bactériennes [38]. Les effets antibactériens sont influencés par la composition chimique de l'huile testé, la méthode expérimentale choisit et la souche bactérienne testé.

Il a été mentionnée que l'action antimicrobienne des huiles essentielles se déroule par une attaque de la paroi bactérienne par les huiles essentielles ce qui provoque une augmentation de la perméabilité et par la suite la perte des constituants cellulaires, puis une acidification de l'intérieur de la cellule bloquant ainsi la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure. La destruction du matériel génétique induit à la mort de la bactérie [39]. D'autre part, l'action bactérienne des huiles essentielles dépend à la fois des composés majoritaires, des effets synergiques et des composés mineurs présents.

Les phénols, les alcools et les aldéhydes présents dans les huiles essentielles sont connues d'avoir des activités antimicrobiennes [22]. En effet, les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leurs localisations [40].

Il semble que l'activité des huiles essentielles de *C. monspeliensis* par rapport aux autres huiles est due à sa composition chimique variée en composés oxygénés appartenant à différentes classes chimiques.

L'action inhibitrice des huiles essentielles de *C. albidus* contre la croissance des *C. albicans* ATCC 10231 est due sûrement aux composés sesquiterpéniques présent à un grand pourcentage (93.4%), à leurs composés majoritaires et/ou à l'effet synergique de toutes les molécules. Réellement, Chang et collaborateurs [41], ont rapporté que les sesquiterpènes révèlent une activité antifongique très intéressante supérieure à celle des monoterpènes.

L'activité antibactérienne des différents extraits (étudiée précédemment) est attribuée aux composants présents dans ces extraits. Les résultats obtenus sont liés directement à la diversité quantitative et/ou qualitative de ces composés. En effet, les extraits de plante ont révélé un potentiel antimicrobien élevé du à la présence des polyphénols (tannins, flavonoïdes) connues d'avoir une activité microbienne élevée [32,34].

En conclusion, la valorisation de ces résultats sur terrain constitue une perspective prometteuse, les effets inhibiteurs observés des huiles essentielles des cistes notamment celui de *C. monspeliensis* sont révélatant pour développer de nouveaux agents dans le traitement des infections causées par les bactéries pathogènes, quoi que des recherches supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les propriétés antimicrobiennes des espèces de cistes.

IV.2.3 Evaluation de l'activité antidiabétique

IV.2.3.1 Introduction

Les espèces de cistes sont utilisées dans plusieurs pays pour traiter le diabète. En Turquie, l'infusion des feuilles de *C.laurifolius* est employée en médecine traditionnelle comme hypoglycémiant [42]. Au Maroc, plusieurs espèces de cistes, à savoir *C. monspeliensis* et *C.salvifolius* sont employées pour traiter l'hyperglycémie [43]. Les espèces de cistes qui poussent en Algérie ne sont pas trop explorées comme source de métabolites ayant un potentiel thérapeutique (antidiabétique).

IV.2.3.2 Activité inhibitrice de l' α -amylase

Dans cette partie, nous avons envisagé d'estimer l'activité antidiabétique des huiles essentielles de *C.ladaniferus*, *C.albidus* et *C.monspeliensis* si elle existe. Les tests *in vitro* « α -amylase » et « α -glucosidase » sont les plus utilisés. Nous avons choisis de tester nos huiles essentielles sur l'activité de l' α -amylase pancréatique d'origine porcine. Cette enzyme est connue dans le catabolisme des polysaccharides en unités plus petites



Fig.41 : Evaluation de l'activité inhibitrice de l' α -amylase

L'activité antidiabétique des huiles essentielles est exprimée par le calcul de la concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique (Tableau 12). La valeur d' CI_{50} permet d'estimer la capacité inhibitrice de nos huiles. Les résultats sont comparés avec un inhibiteur standard « Acarbose » utilisé dans le traitement du diabète sucré de type 2 [44].

Les Figures (42, 43, 44 et 45) traduisent la variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles en fonctions des concentrations utilisées.

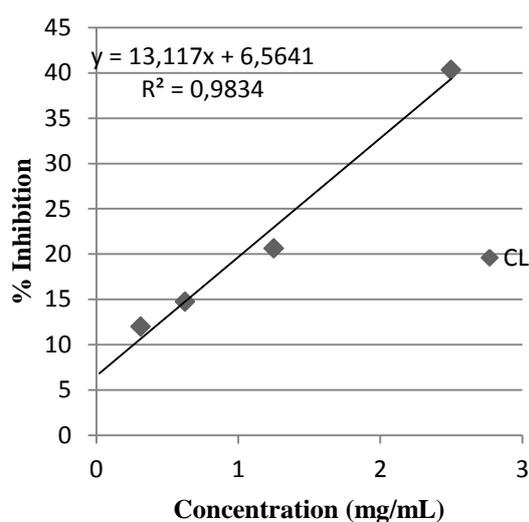


Fig. 42 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CL (*C. ladaniferus*) en fonction des concentrations

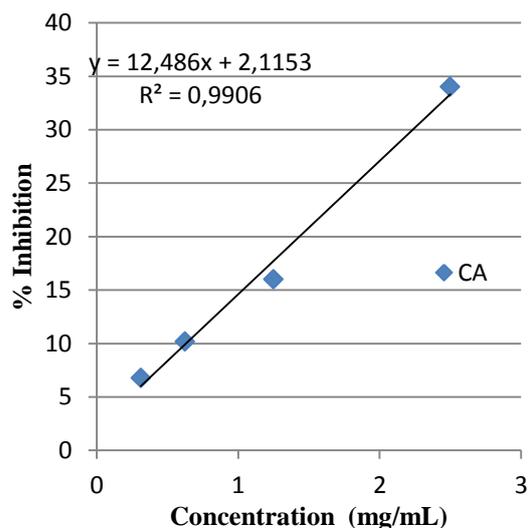


Fig. 43: Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CA (*C. albidus*) en fonction des concentrations

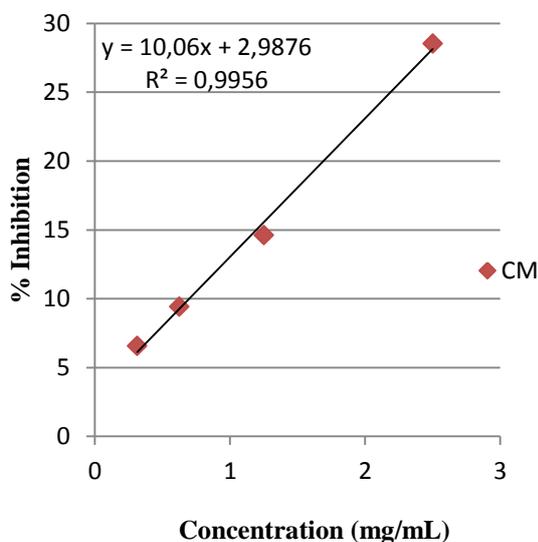


Fig. 44 : Variation du pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de CM (*C. monspeliensis*) en fonction des concentrations.

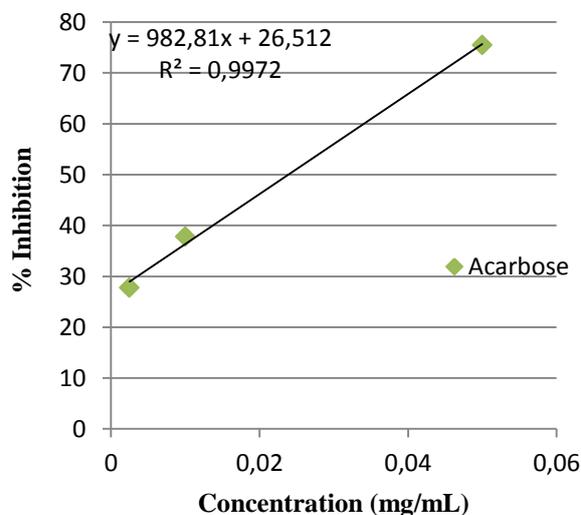


Fig. 45: Variation du pourcentage d'inhibition de l'acarbose en fonction des concentrations.

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Les résultats de l'activité antidiabétique sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 12. Potentiel hypoglycémiant *in vitro* des HE (huiles essentielles) de *C. ladaniferus* (CL) ; *C. albidus* (CA) ; *C. monspeliensis* (CM)

Extrait		Activité inhibitrice de l' α -amylase			
HEs (CL)	Concentration (mg/mL)	0,31	0,62	1,25	2,5
	% Inhibition	12,00	14,74	20,64	40,35
	CI ₅₀ (mg/mL)	3,31			
HEs (CA)	Concentration (mg/mL)	0,31	0,62	1,25	2,5
	% Inhibition	6,78	10,18	15,99	34,03
	CI ₅₀ (mg/mL)	3,83			
HEs (CM)	Concentration (mg/mL)	0,31	0,62	1,25	2,5
	% Inhibition (mg/mL)	6,56	9,40	14,61	28,52
	IC ₅₀ (mg/mL)	4,67			
Acarbose	Concentration (mg/mL)	0,0025	0,01	0,05	
	% Inhibition	27,77	37,76	75,42	
	CI ₅₀ (mg/mL)	0,024			

Discussion

Il est clair d'après le Tableau 12, que le pourcentage d'inhibition de tous les extraits (Huiles essentielles et Acarbose) augmente avec l'augmentation de la concentration.

Les huiles essentielles de *C. ladaniferus* présentent les valeurs les plus élevées en terme de pourcentage d'inhibition (40,35% à 2,5mg/mL) suivi par les huiles essentielles de *C.albidus* (34,03%) pour la même concentration. Les huiles essentielles de *C.monspeliensis* se sont révélées moins actives (28,52%).

L'acarbose utilisé comme molécule de référence présente le pourcentage le plus élevée d'inhibition (75,42% à 0,05 mg/mL).

L'efficacité des extraits à inhiber l'activité enzymatique de l' α - amylase exprimée en CI₅₀ est classée comme suit : Acarbose (CI₅₀= 0,024mg/mL) > *C. ladaniferus* (CI₅₀= 3,31mg/mL) > *C. albidus* (CI₅₀= 3,83mg/mL) > *C. monspeliensis* (CI₅₀= 4,67 mg/mL).

Au premier coup d'œil, nous pensons que la capacité antidiabétique des huiles essentielles des cistes par le test α -amylase est due principalement à leurs composés

dominants, mais l'effet synergique de certains composants ou même l'influence des composés minoritaires, ne sont pas à exclure.

L'activité des huiles essentielles de *C. albidus* vis-à-vis l'enzyme est due exclusivement aux composés sesquiterpéniques. Ces derniers sont connus dans la littérature d'avoir plusieurs activités biologiques parmi lesquelles l'inhibition de l' α -amylase [45]. Par conséquent, l'activité des huiles de *C. ladaniferus* accrue, semble avoir due à l'association de toutes les molécules monoterpéniques et sesquiterpéniques. L'activité inhibitrice de l' α -amylase par les huiles essentielles des cistes, indique leurs effets hypoglycémiantes et par conséquent leurs capacités à prévenir du diabète.

Les études sur l'activité antidiabétique des huiles essentielles des trois espèces de cistes n'ont pas été rapportées auparavant d'après les informations disponibles. Cependant, quelques études ont été menées sur les extraits. Au Maroc, Sayah et collaborateurs [43] ont étudié des extraits aqueux et méthanoliques de la partie aérienne de *C. salviifolius* et *C. monspeliensis*. L'aboutissement de cette recherche, a révélé une capacité élevée des extraits de ces espèces à inhiber l'activité enzymatique « α -amylase ». En effet, en terme de concentration minimale inhibitrice, l'extrait aqueux de *C. salviifolius* exhibe une forte activité ($CI_{50} = 217,50 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$) que celle de l'acarbose ($CI_{50} = 311,20 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$) et celle de l'extrait méthanolique et aqueux de *C. monspeliensis* ($CI_{50} = 706,50 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$), ($CI_{50} = 886,10 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$) respectivement. La composition chimique de ces extraits est constituée par les composés phénoliques, les flavonoïdes et les proanthocyanidines. La bonne activité des extraits est due à l'effet des molécules bioactives présentes qui agissent en synergie d'après l'auteur.

L'effet inhibiteur *in vitro* des extraits de *C. laurifolius* poussant en Turquie sur l' α -amylase et a été évalué par Orthan et collaborateurs [42]. L'extrait éthanolique des feuilles exhibe un effet hypoglycémiant supérieur (75,3%) à celui de l'acarbose (73,7%) et à l'extrait aqueux (60,5%) à la concentration de 3000 $\mu\text{g/mL}$. L'extrait éthanolique étant riche en composés phénoliques (flavonoïdes) qui sont connus d'avoir des propriétés antidiabétiques très intéressantes.

L'analyse d'autres études sur d'autres espèces, révèlent que les monoterpènes présentent aussi des propriétés antidiabétiques. En effet, Les huiles essentielles de la partie aérienne de l'*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. de Tunisie, riche en monoterpènes oxygénés et hydrocarbonés, exercent une forte activité inhibitrice contre l' α -amylase. Le carvacrol (composé majoritaire) contribue à l'activité inhibitrice de l'enzyme d'après l'auteur [46].

Dans un autre travail effectué sur les extraits aqueux du thé vert et des pépins de raisin, les résultats ont indiqué un potentiel élevé des pépins de raisin ($CI_{50} = 8,7 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) à inhiber l'activité α -amylase, suivie du thé vert ($CI_{50} = 34,9 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$). L'acarbose, molécule de référence, indique une CI_{50} de ($6,9 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$). La composition des extraits étant riche en catéchines [47].

En conclusion, notre étude fait apparaître les espèces de cistes comme une source prometteuse de molécules bioactives. Les espèces de cistes peuvent être considérées comme agents thérapeutiques pour contrôler l'hyperglycémie. Cependant, une étude *in vivo* sera nécessaire pour valider les résultats *in vitro* obtenus.

IV.2.4 Activité insecticide

IV.2.4.1. Introduction

Durant leur stockage, les graines des légumineuses subissent des pertes considérables par plusieurs ravageurs, principalement *Callosobruchus maculatus*. En Algérie, les pesticides de synthèse restent le moyen le plus utilisé pour la protection des denrées stockées. Ils engendrent des effets néfastes sur l'homme et l'environnement, en plus des phénomènes de résistance chez les ravageurs.

Dans la perspective d'élaborer une nouvelle approche de protection des légumineuses contre *C. maculatus*, les huiles essentielles de *C. ladaniferus*, *C. albidus* et *C. monspeliensis* ont été testées sur cet insecte ravageur.

IV.2.4.2 Evaluation de la mortalité des adultes de *C. maculatus* par les huiles essentielles

Les tests de toxicité effectués sur les adultes de *C. maculatus* par application des huiles essentielles des trois espèces de cistes, à trois doses différentes (2, 5 et 10 $\mu\text{l}/10\text{g}$ de graines de pois chiche), ont été suivis tous les 24 heures pendant deux jours. L'insecticide chimique a été testé sur les bruches suivant la même procédure.

Les moyennes de mortalité en fonction des doses utilisées (des huiles essentielles et de l'insecticide chimique) sont indiquées dans les figures suivantes :

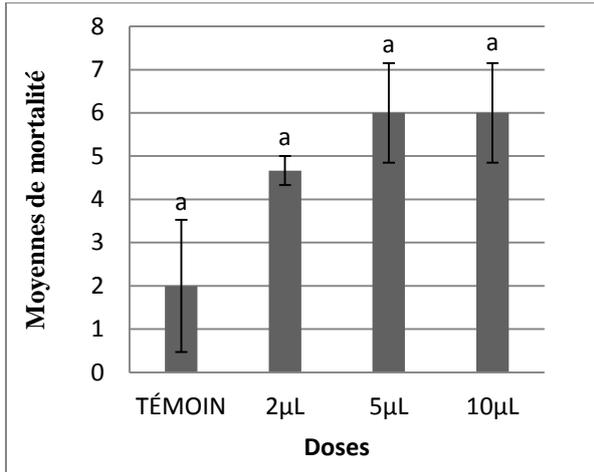


Fig .46 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de *C.ladaniferus*

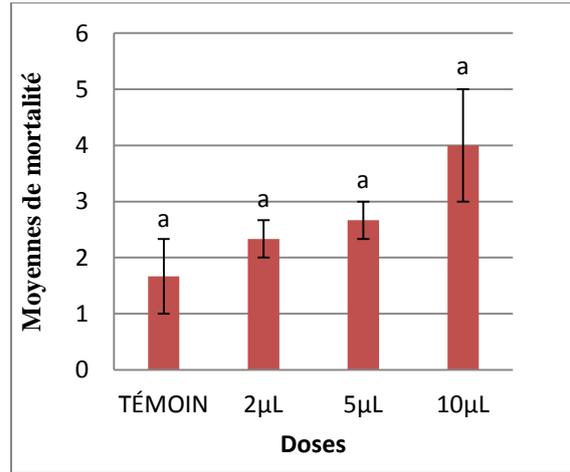


Fig.47 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de *C.monspeliensis*

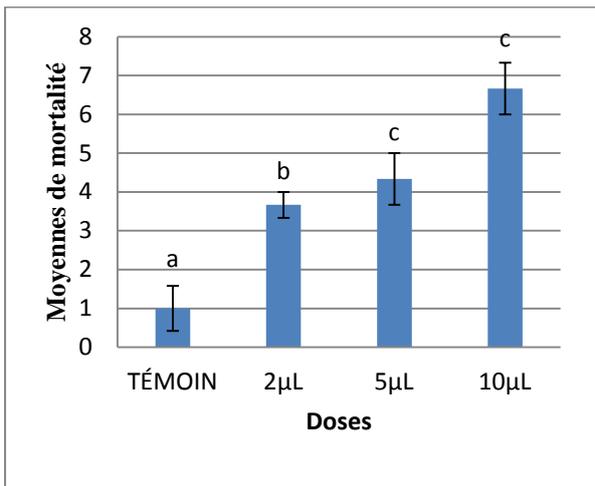


Fig .48 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de *C.albidus*

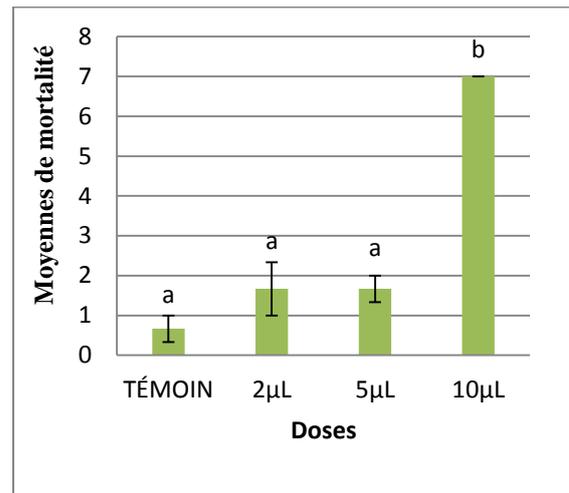


Fig.49 : Moyennes de mortalité de *C. maculatus* en fonction des doses de l'insecticide chimique (Decis, 25 EC)

Les résultats indiquent que le taux de mortalité des insectes augmente avec la concentration. Néanmoins, pour les huiles essentielles de *C. ladaniferus*, à des doses de 5 et 10 µL, la valeur de la moyenne de mortalité reste la même (Figure 46). D'autre part, les huiles essentielles de *C.monspeliensis* ont révélé un taux de mortalité inférieur à celui des huiles essentielles des autres cistes (Figure 47). Quand aux huiles essentielles de *C.albidus*, à des

doses inférieures à 10 μ L, la toxicité des huiles s'est révélée supérieure à celle de l'insecticide chimique (Figures 48 et 49).

Le test (ANOVA I) appliqué aux résultats obtenus, a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les doses de *C. ladaniferus* et de *C. monspeliensis*, ni avec les doses du témoin, ni même entre les doses après 24 h d'exposition ($p = 0,1099$). Le test de Tukey a révélé l'existence d'un seul groupe pour les huiles essentielles des deux espèces (Figures 46 et 47). En contre partie, les résultats obtenues après le traitement de *C. maculatus* avec les huiles essentielles de *C.albidus*, ont montré une différence hautement significative avec le témoin et entre les doses ($p <0,001$). Le test de Tukey a révélé l'existence de trois groupes à savoir le groupe témoin, le groupe de concentration (2 μ l/10g de gaines) et le groupe des concentrations (5 et 10 μ l/10g de graines) (Figure 48).

Concernant, l'insecticide appliqué sur les adultes de *C. maculatus*, l'analyse de variance a montré qu'il y a une différence hautement significative entre le témoin et l'insecticide ($p <0,001$). Le test de Tukey a révélé l'existence de deux groupes. Le premier regroupe le témoin avec les deux doses (2 et 5 μ l/ 10g de graines), alors que la dose de (10 μ l/ 10g de graines) a été classé dans un autre groupe (Figure 49).

Le pourcentage de mortalité des adultes *C.maculatus* a été évalué pendant 24h pour une durée de 48h. Les résultats sont présentés dans les figures (50, 51,52, 53).

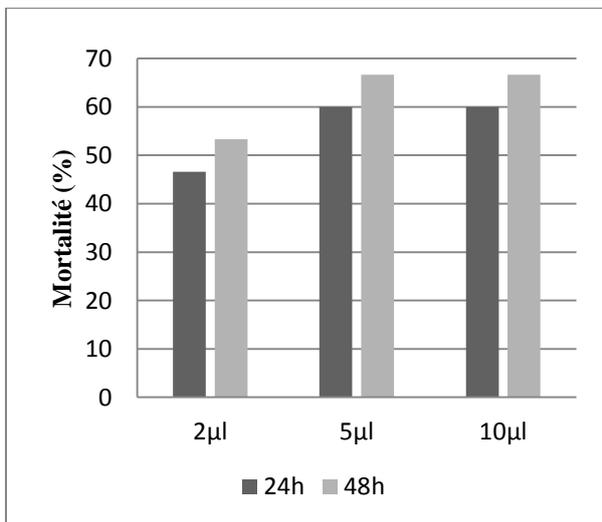


Fig.50 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses des huiles essentielles de *C.ladaniferus*

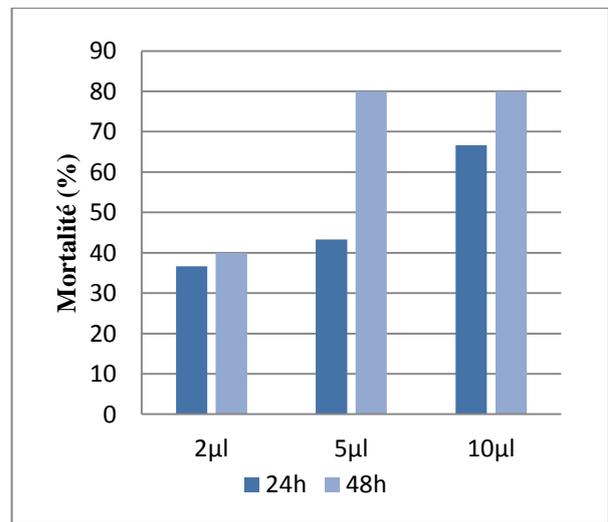


Fig.51 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses des huiles essentielles de *C.albidus*

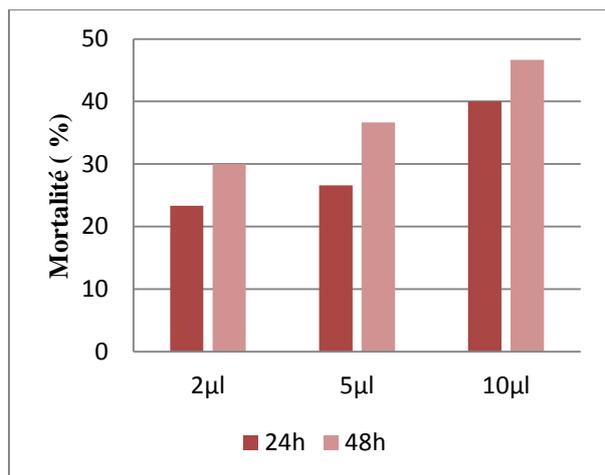


Fig. 52 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses des huiles essentielles de *C.monspeliensis*

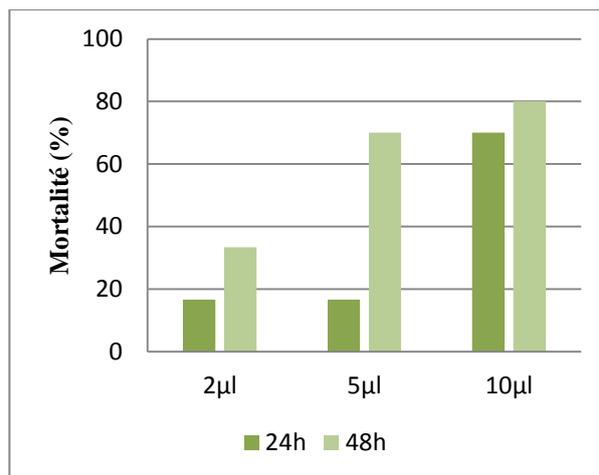


Fig.53 : Evolution de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction du temps et des doses de l'insecticide chimique (Decis, 25 EC)

D'après les figures, nous constatons que le pourcentage de la mortalité des adultes de *C.maculatus* augmente d'un jour à un autre (de 24h à 48h). L'analyse de variance révèle qu'il n'ya pas une différence significative que ça soit pour les huiles essentielles des différents cistes ou pour l'insecticide chimique. En effet, $p = 0,634$ pour *C.ladaniferus*, $p= 0,541$ pour *C.albidus*, $p= 0,194$ pour *C.monspeliensis* et $p=0,346$ pour l'insecticide Decis, 25 EC.

Le pourcentage de mortalité des insectes reste le même pour des doses respectives de 5 et 10 µL après 24 h et 48h d'exposition aux huiles essentielles de *C.ladaniferus*. D'autre part, le pourcentage de mortalité des insectes par l'effet toxique des huiles essentielles de *C.albidus* après 48h de traitement à des doses de 5µL et 10µL est identique. En revanche, les huiles essentielles de *C.monspeliensis* expriment le pourcentage de mortalité le plus faible après 24h et 48h.

IV.2.4.3 Comparaison de la toxicité des huiles essentielles des trois cistes sur les adultes de *C.maculatus*

Les pourcentages de mortalité des bruches après deux jours, ont été transformés en probits. La régression de données en fonction du logarithme de la dose en huiles essentielles, a permis de calculer la DL_{50} et la DL_{90} . Les résultats des calculs sont regroupés dans le Tableau 13.

CHAPITRE IV : Résultats et Discussion

Tableau 13. Valeurs des DL₅₀ et DL₉₀ (µL/10g de graines) calculées

	DL ₅₀ (µL/10g de graines)	DL ₉₀ (µL/10g de graines)
<i>C. ladaniferus</i>	13	179
<i>C. albidus</i>	5	12
<i>C. monspeliensis</i>	49	780
Insecticide (Decis, 25EC)	9	33

L'analyse des données du (Tableau 13) indique une activité très intéressante des huiles essentielles de *C.albidus* par rapport aux huiles essentielles de *C.ladaniferus* et *C.monspeliensis* et par rapport à l'insecticide de référence. Réellement, en terme d'activité insecticide : *C.albidus* (DL₅₀= 5µL/10g de graines ; DL₉₀=12µg/10g de graines) > Decis, 25EC (DL₅₀= 9µL/10g de graines ; DL₉₀=33µg/10g de graines) > *C. ladaniferus* (DL₅₀= 13µL/10g de graines ; DL₉₀=179µg/10g de graines) > *C.monspeliensis* (DL₅₀= 49µL/10g de graines ; DL₉₀=780/10g de graines).

Discussion

Les résultats obtenus préalablement montrent que les huiles essentielles des trois cistes présentent une activité insecticide contre les adultes de *C. maculatus*. Ces résultats ont été confirmés par les valeurs des DL₅₀ et DL₉₀ calculées à partir de la formule de la droite de régression. Les huiles essentielles de *C.albidus* ont manifesté la meilleure activité insecticide, les DL₅₀ et DL₉₀ calculées sont inférieures à celles de l'insecticide chimique. D'autre part, L'analyse statistique indique que l'efficacité des huiles essentielles varie selon la plante testée et la concentration d'huile essentielle utilisée.

L'activité des plantes insecticides est relative, elle dépend de la quantité des graines, de la nature des substances actives et de la vitesse d'absorption par les graines. En effet, La mortalité des insectes est réduite quand la vitesse d'absorption des composés actifs par les graines est grande. D'autre part, pour une même huile essentielle, certains composés pénètrent mieux que d'autres. Les composés terpéniques pénètrent moins que les composés soufrés [48].

D'après Ketoh et collaborateurs [49], le produit à forte toxicité insecticide est celui qui provoque une grande mortalité dans la population des insectes adultes à faible concentration, c'est le cas des huiles essentielles de *C.albidus*. Les effets toxiques semblent dépendre de la composition chimique des huiles essentielles de *C. albidus*. L'activité insecticide des huiles essentielles de *C.albidus* est due aux sesquiterpènes. D'autre part, l'effet toxique des huiles

essentielles de *C.ladaniferus* provient de l'activité de composés monoterpéniques et sesquiterpéniques. Effectivement, l'étude de Toudert-Taleb [50], révèle que les propriétés répulsives des huiles essentielles sont souvent associées à la présence des monoterpènes et sesquiterpènes, quoi que les effets toxiques dépendent des espèces d'insectes, de la plante et du temps d'exposition à l'huile essentielle [51]. D'un autre côté, les huiles essentielles de *C.monspeliensis* ont exhibé une faible activité insecticide par rapport aux huiles essentielles des autres espèces, cela peut être expliqué par l'absence des monoterpènes hydrocarbonés dans la composition des huiles. Néanmoins, l'activité insecticide des huiles essentielles ne peut pas se limiter seulement aux constituants majoritaires, elle pourrait être due à l'effet synergique de plusieurs constituants ou à certains composés minoritaires [52].

Très peu de travaux ont été menés sur les effets toxiques des huiles essentielles des cistes. Les huiles essentielles extraites des feuilles de *C.ladaniferus* poussant dans la forêt de Zarifet (Tlemcen) ont été testées sur trois espèces de bruches à savoir *Bruchus rufimanus*, *Callosobruchus maculatus* et *Acanthoscelides obtectus*, à différentes doses allant de 1 à 5 µL/30g de graines. Les résultats ont montré que les huiles extraites de *C. ladaniferus* entraînent chez les femelles des bruches étudiées une réduction significative de la fécondité des femelles. La DL₅₀ calculée après 48 heures d'exposition, montre la grande toxicité de ces huiles essentielles sur *A. obtectus* avec une DL₅₀ = 4,13 µL/30 g de graines, une toxicité un peu variable sur les deux bruches *C. maculatus* et *B. rufimanus* avec des DL₅₀ respectives de 5,37 µL/30 g de graines et 7,24 µL/30 g de graines. La composition des huiles essentielles du ciste étant dominé par les monoterpènes : borneol (9,32 %) et le copraborneol (12,5 %), alors que le terpinène-4ol, le camphène, le α-terpinène et le p-cymène sont représentés en faibles pourcentages [53].

Plusieurs chercheurs se sont investigués dans l'étude de l'activité insecticide des huiles essentielles sur l'espèce *C.maculatus*, citons quelques travaux :

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation des feuilles de deux plantes aromatiques de l'Afrique occidentale *Melaleuca quinquenervia* (L), et *Ocimum gratissimum* (L), ont été testées par fumigation à différentes concentrations sur la forme non voilière de *C. maculatus*. Ces huiles révèlent une activité insecticide et entraînent, chez les femelles de *C. maculatus*, une réduction très significative de la ponte par rapport à celle dans le témoin. L'huile essentielle de *M. qinquenervia* (L.), avec une DL₅₀ = 3,09 µL/L, semble plus toxique que celle de *O. gratissimum* (L) (DL₅₀=6,99 µL/L) [54]. L'efficacité des huiles essentielles de

M. quinquevervia (L.) est induite par l'action des composés majeurs comme l'eucalyptol (52%) et le limonène (13%) [54].

Le travail établi par Bouchikhi Tani et collaborateurs [55] sur les effets toxiques des huiles essentielles de l'*Origanum glandulosum* sur les adultes de trois bruches : *Acanthoscelid obtectus*, *Bruchus rufimanus* et *Callosobruchus maculatus*, a abouti à l'estimation des DL₅₀ des huiles essentielles et par la suite à l'évaluation de l'activité insecticide qui a reflété une grande toxicité envers *A. obtectus* (DL₅₀= 1,44µL/30g de graines), une toxicité un peu variable sur *C.maculatus* (DL₅₀= 7,72 µL/30g de graine), et une toxicité faible envers *B. rufimanus* (DL₅₀= 2,06µL/30g de graine). L'analyse de la composition chimique montre la richesse des huiles essentielles en composés connus pour leurs propriétés insecticides comme l' α -pinène, limonène, carvacrol et le thymol [55].

En conclusion, notre étude indique l'effet toxique des huiles essentielles extraites des trois espèces de cistes envers *C. maculatus*, espèce reconnue nuisible des denrées stockées. La meilleure contribution a été constatée pour les huiles essentielles de *C.albidus* qui ont dévoilé une activité insecticide impressionnante plus grande que l'insectide chimique (Decis, 25 EC). Ces travaux pourraient être poursuivis dans le but d'investir ces huiles essentielles pour une utilisation pratique dans la protection des denrées stockées.

Références Bibliographiques

- [1] Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M. (2007). Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. *Afrique Science*, 03(02) : 232-242.
- [2] Robles, C., Garzino, S. (1998). Essential oil composition of *Cistus Albidus* leaves. *Phytochemistry*, 48(8): 1341-1345.
- [3] Mariotti, J. P., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., Bernardini, A. F. (1997). Composition of the Essential Oil of *Cistus ladaniferus* L., cultivated in Corsica (France). *Flavour and Fragrance Journal*, 12: 147-151.
- [4] Gülz, P.G., Kobold, U., Michaelis, K., Vostrowsky, O. (1984). The Composition of terpene hydrocarbons in the essential oils from leaves of four *Cistus* species. *Zeitschrift für Naturforschung*, 39c: 699-704.
- [5] Rossi, P.G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A. (2007). Antibacterial action of Essential Oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research*, 19: 176-182.
- [6] Greche, H., Mrabet, N., Zrira, S., Ismaili-Alaoui, M., Benjilali, B., Boukir, A. (2009). The Volatiles of the Leaf Oil of *Cistus ladanifer* L. var. *albiflorus* and Labdanum Extracts of Moroccan origin and their Antimicrobial Activities. *Journal of Essential Oil Research*, 21: 166-173.
- [7] Martos, M.V., Sendra, E., Pérez- Alvarez, J.A., Lopez, J.F., Amensour, M., Abrini, J. (2011). Identification of Flavonoid content and chemical composition of the essential oils of Moroccan herbs: Myrtle (*Myrtus communis* L.), Rockrose (*Cistus ladanifère* L.) and Montpellier cistus (*Cistus monspeliensis* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 23(2): 1-9.
- [8] Gomes, P.B, Mata, G., Rodrigues, A.E. (2005). Characterization of the Portuguese-grown *Cistus ladanifer* Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research*, 17(2): 160-165.
- [9] Verdeguer, M., Amparo Blazquez, M., Boira, H. (2012). Chemical composition and herbicidal activity of the essential oil from a *Cistus ladanifer* L. population from Spain. *Natural Product Research*, 26 (17): 1602-1609.
- [10] Rincon, J., Delucas A, Gracia, I. (2000). Isolation of Rock rose Essential Oil using supercritical CO₂ Extraction. *Separation Science and Technology*, 35 (16):2745-2763.
- [11] Zidane, H., Elmiz, M., Aouinti, F., Tahani, A., Wathelet, J., Sindic, M., Elbachiri, A., (2013). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts of *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* growing in Eastern Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 12 (34): 5314-5315.

- [12] Paul, J. P., Negueruela, A.V., Alonso, M.J.P., Sanz, J. (2005). Seasonal variation in chemical composition of *Cistus albidus* L. from Spain. *Journal of Essential oil Research*, 17:19-22.
- [13] Paoilini, J., Tomi, P., Bernardini, A. F., Bradesi, Casanova, P., Kaloustian, J.J. (2008). Detailed analysis of the essential oil from *Cistus albidus* L. by combinaison of GC/RI, GC/MS and ¹³C- NMR spectroscopy. *Natural Product Research* , 22 (14): 1270-1278.
- [14] Angelopoulou, D., Demetzos, C., Dimas, C., Perdetzoglou, D., Loukis, A. (2001). Essential oils and hexane extracts from leaves and fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic activity of *ent*-13-*epi*-Manoyl Oxide and its Isomers. *Planta Medica* , 30:189-203.
- [15] Lopez, J. L., Rodrigues, R., Cuerva, J. M., Enrique Oltra, J. (2005). Composition of the essential Oils of *Cistus ladaniferus* and *Cistus monspeliensis* from Morocco. *Journal of Essential oil Research*, 17: 553-555.
- [16] Loizzo, M. R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., Tundis, R. (2013). Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food and Chemical toxicology*, 59: 586-594.
- [17] Laib I., Barkat M. (2011). Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *lavandula officinalis*, *Agriculture*, 12, 89-101.
- [18] Guimarães, R., Sousa, M. J., & Ferreira, I. C.F.R. (2010). Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 32(2):152–156.
- [19] Nicoletti, M., Toniolo, C., Venditti, A., Bruno, M., Ben Jemia, M. (2015). *Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian Cistus: Cistus monspeliensis, Cistus villosus and Cistus libanotis*. *Natural Product Research*, 29(3): 223-230.
- [20] Hammoudi, R., Dehak, K., Hadj Mahammed, M., Didi Ouldelhadj , M. (2015). Activité antioxydante des huiles essentielles de *Deverra scoparia* coss. & *Dur.* (Apiaceae). *Lebanese Science Journal*, 16(2), 27 -36.
- [21] Edris., A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research* (In press). 21(4): 308-323.
- [22] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- [23] Miguel, M.G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15, (12): 9252-9287.

- [24] Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantinc, C., Muzzoli, M., Dehesad, M., Romagnolie, C., Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (*Lauraceae*) flower calices. *Food Chemistry*, 85: 415-421.
- [25] Cos P., Arnold J. V., Dirk V.B., Louis M. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.
- [26] Nair S.M., Joseyphus S.R. (2008). Synthesis and characterization of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes of tridentate Schiff base derived from vanillin and dl- α -aminobutyric acid. *Spectrochimica Acta Part A*, 70 : 749–753.
- [27] Özçelik B., Gürbüz I., Karaoglu T., Yeşilad E. (2007). Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Microbiological Research*. 64(5): 545-552.
- [28] Nath M., Song X., Eng G. et Kumar A. (2008). Synthesis and spectral studies of organotin(IV) 4-amino-3-alkyl-1,2,4-triazole-5-thionates: In vitro antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A*, 70 : 766–774.
- [29] Rossi, P.G., Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A. (2007). Antibacterial action of Essential Oils from Corsica. *Journal of Essential oil Research*, 19: 176-182.
- [30] Greche, H., Mrabet, N., Zrira, S., Ismaili-Alaoui, M., Benjilali, B., Boukir, A. (2009). The Volatiles of the Leaf Oil of *Cistus ladanifer* L. var. *albiflorus* and Labdanum Extracts of Moroccan origin and their Antimicrobial Activities. *Journal of Essential Oil Research*, 21: 166-173.
- [31] Mohammedi Z., Atik F. (2011). Antibacterial Activity of Essential Oils from *Cistus ladaniferus* L. and *Lavandula stoechas* L. *International Journal of Pharmatech research*, 3(1): 484-487.
- [32] Benayad, N., Mennane, Z., Charof, R., Hakiki, A., Mosaddak, M. (2013). Antibacterial activity of essential oil and some extracts of *Cistus ladaniferus* from Oulmes in Morocco. *Journal of Materials of Environmental Science*, 4 (6): 1066-1071.
- [33] Boukili, M., Chakir, S., Filali Rhazi, F., Fikri Benbrahim, K., Haloui, Z., Ouahbi, A., Elhourri, M., Echchgadda, G. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of the

essential oil of *cistus ladanifer* var. *maculatus* dun. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(3): 925-930.

[34] Ferreira, S., Santos, J., Puarte, A., Duarte, A.P., Queiros, J.A., Domingues, F.C. (2012). Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural Product Research*, 26(16): 1558-1560.

[35] Güvenç, A., Yıldız, S., Özkan, A. M., Erdurak, C. S., Coşkun, M., Yılmaz, G., Okuyama, T., Okada, Y. (2005). Antimicrobiological Studies on Turkish *Cistus*. Species. *Pharmaceutical Biology*, 43(2), 178–183

[36] Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V. (2010). Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2273–2282.

[37] Barros, L., Dueñas, M., Alves, C. T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41: 41–45.

[38] Ahmad, I., Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnomedicine*, 74: 113-123.

[39] Bouyahia, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N. (2018). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), S173-S183.

[40] Bel Hadj Salah-Fatnassi, K., Slim-Bannour, A., Harzallah Skhiri, F., Ali Mahjoub, M., Mighri, Z., Chaumont, J.P, Aouni, M. (2010). Activités antivirale et antioxydante in vitro d'huiles essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie, *Acta Botanica Gallica*, 157 (3), 433-444, 2010.

[41] Chang, H., Cheng, Y., W., C., Chang, S., Chang, T., Su, Y. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technology*, 99: 6266–6270.

[42] Orhan, N., Aslan, M., Şüküroğlu, M., Deliorman Orhan, D. (2013). In vivo and in vitro antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC–TOF–MS analysis. *Journal of Ethnopharmacology*. 146(3) : 859–865

[43] Sayah, K., Marmouzi, I., Mrabti, H.N. Cherrah, Y., Faouzi, M. (2017). Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.)

aerial parts extracts against key enzymes linked to hyperglycemia. *BioMed Research International*. 2017: 1-7.

[44] Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *The Lancet*. 359(9323): 2072-2077.

[45] Loizzo, M.R., Saab, A.M., Statti, G.A., Menichini, F. (2007). Short report: composition and α -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. *Fitoterapia*, 78: 323-326.

[46] Bejaoui, A., Boulila, A., Boussaid, M. (2013). Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf., from Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(32): 2429-2435.

[47] Yilmazer-Musa, M., Griffith, A. M., Michels, A. J., Schneider, E., Frei, B. (2012). Grape Ssd and tea extracts and catechin 3-Gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36): 8924–8929.

[48] Toufique, B.M., Moumouni, A., Kadidjatou, H.H., Doumma, A. (2014). Etude de quelques facteurs influençant l'efficacité de l'activité insecticide de *Boscia senegalensis* Lam (Ex. Poir) dans le contrôle de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera-Bruchinae), ravageur du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 8 (01), pp. 320-327.

[49] Ketoh, G. K., Glitho, I. A., Koumaglo, H. K (2004). Activité insecticide comparée des huiles essentielles de trois espèces du genre *Cymbopogon* genus (Poaceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 18: 21-34

[50] Toudert-Taleb, K., Hedjal-chebheb, M., Hami, H., Debras, J.F., Kellouche, A. (2014). Composition of essential oils extracted from six aromatic plants of kabylian origin (Algeria) and evaluation of their bioactivity on *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1175) (Coleoptera: Bruchidae). *African Entomology*, 22(2): 417-427.

[51] Kim, S., Roh, J., Kim, D., Lee, H., and Ahn, Y. (2003). Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*, 39: 293-303.

[52] Ndomo A.F., Tapondjou A.L., Tendonkeng F., Tchouanguép F.M. (2009). Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemonviminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera ; Bruchidae). *Tropicultura Journal*, 27 (3) : 137-143.

[53] Bouchikhi-tani, Z., Khelil, M.A. (2013). Lutte contre trois bruches *Bruchus rufimanus*, *Callosobruchus maculatus* et *Acanthoscelides obtectus* avec les huiles essentielles extraites de *Cistus ladaniferus* (Cistaceae). *Ecologia mediterranea*, 39 (2) : 85-92.

[54] Seri-Kouassi, B. P., Kanko, C., Aboua, L. R. N., Bekon, K. A., Glitho, A. I., Koukoua, G., N'Guessan, Y. T. (2004). Action des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire sur *Callosobruchus maculatus* F. du niébé. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1043-1046.

[55] Bouchikhi Tani, Z., Khelil, M., A., Bendahou, M., Pujade-Villar, J. (2012). Lutte contre les trois bruches *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831), *Bruchus rufimanus* Boheman, 1833 et *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera : Chrysomelidae : Bruchinae) par les huiles essentielles extraites d'*Origanum glandulosum* (Lamiacées). *Butlleti de la Institució Catalana d'Historia Natural*, 76: 177-186

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude de la composition chimique et des activités biologiques des huiles essentielles de la partie aérienne de trois espèces de cistes poussant en Algérie. Il s'agit de : *C. ladaniferus* L., *C. albidus* L. et *C. monspeliensis* L. Les informations ethnobotaniques obtenues révèlent que ces espèces sont utilisées dans le traitement de diverses pathologies. A notre connaissance, aucune étude chimique n'a été réalisée sur les huiles essentielles de ces espèces. D'autre part, très peu de travaux ont été publiés sur l'activité biologique des huiles essentielles dans le pays.

L'extraction des huiles essentielles a été menée par hydrodistillation avec un appareil de type Clevenger. Le rendement obtenu pour *C.ladaniferus* est le plus élevé (0,08%) suivi de *C. albidus* (0,02%) et *C.monspeliensis* (0,003%).

Les huiles essentielles ainsi obtenues sont soumises à des analyses chimiques. Le couplage CPG-FID et CPG/SM révèle un profil chimique différent des huiles essentielles des trois espèces. Réellement, Les terpénoïdes (monoterpènes et sesquiterpènes) sont dominants dans la composition des huiles essentielles de *C.ladaniferus* à savoir : 5,7-di-épi- α -eudesmol (13,6%), bornéol (12,5%), camphène (12,2%), δ -cadinène (7,6%), viridiflorol (6,4%), 4-terpinéol (5,7%) et l' α -pinène (4,2%). Quand aux huiles essentielles de *C.albidus*, la formule chimique des huiles essentielles est caractérisée par l'abondance totale des sesquiterpènes représentés par : épi- α -bisabolol (11,4%), β -bourbonène (8,7%), ar-curcumène(8,3%), α -zingibérène (7,4%), γ -muurolène (5,6%), 14-hydroxy- α -urolène (5,2%), β -caryophyllène (4,5%), 1,10-di-épi-cubénoïl (4,4%), t-cadinol (4,0%), δ -cadinène (3,1%), ar-turmérol (2,9%), 1-épi-cubénoïl (2,9%), Oxyde de caryophyllène (2,8%), t-muurolol(2,5%), α -guaïène (2,4%) et α -eudésmol (2,2%). D'autre part, la composition des huiles essentielles de *C.monspeliensis* est représentée principalement par les diterpènes oxygénés, les dérivés non terpéniques et les apocarotènes : épi-13-Oxide de manoyl (28,6%), kaur-16-ène (8,1%), nonanal (5,4%), *cis*- α -Ambrinol (3,3%) et (*E*)- α -Ionone (3,0%).

Nous avons soumis les huiles essentielles des trois espèces à des études biologiques à savoir : l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne, l'activité antidiabétique et l'activité insecticide, dans le but de leur valorisation pour une meilleure exploitation dans le domaine pharmaceutique, en industrie alimentaire, en agronomie et en cosmétique.

L'étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles par trois méthodes (DPPH, FRAP et β -carotène) a révélé le potentiel antioxydant élevé des huiles essentielles de *C. monspeliensis* dans les tests (DPPH et FRAP) par rapport aux huiles essentielles de *C.ladaniferus* et

Conclusion Générale

C.albidus. Effectivement, pour le test DPPH, la CI_{50} a été évaluée à 6,18mg/mL pour les huiles de *C.monspeliensis* contre des CI_{50} respectives de 13,71 et 16,44 mg/mL pour les huiles de *C.albidus* et *C.ladaniferus*. Cependant, dans le test β -carotène, les huiles essentielles de *C.monspeliensis* ont manifesté un comportement distinct. Cette différence peut s'expliquer par le fait que pour un même échantillon, l'activité antioxydante dépend de la méthode utilisée. Les CI_{50} pour *C.ladaniferus*, *C.albidus* et *C.monspeliensis* ont été évaluées (dans le test β -carotène) à des valeurs de 5,19 mg/ml ; 2,69 mg/mL et 28,61 mg/mL respectivement. Pour le test FRAP, le pouvoir réducteur des huiles essentielles de *C. monspeliensis* et de l'antioxydant de référence augmente avec la concentration. Notons que les antioxydants standards utilisés dans les trois tests (Vit C et BHT) étaient les plus actifs.

L'activité antioxydante des huiles essentielles testées est en rapport avec la composition chimique, probablement aux composés majoritaires ou par un éventuel effet synergique de toutes les molécules. Généralement, les composés oxygénés présentent une activité antioxydante plus remarquable que les terpènes hydrocarbonés

Ces résultats préalables peuvent faire l'objet d'études plus approfondies pour l'exploitation des propriétés antioxydantes des huiles essentielles de ces trois plantes dans le domaine de la préservation des aliments à l'échelle industrielle.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles *in vitro* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose. La CMI a été aussi évaluée pour les huiles essentielles. Les résultats ont indiqué une activité antibactérienne intéressante exercée par les huiles essentielles de *C.monspeliensis* vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25923 avec un diamètre d'inhibition intéressant qui s'est révélé identique à la Gentamicine (25mm). De plus, le spectre d'action de l'huile est plus large, il s'étend à plusieurs pathogènes D'autre part, les huiles essentielles de *C. ladanifrus* et de *C. albidus* montrent une activité moyenne vis-à-vis de *S. aureus* (quelque soit la charge du disque) et de *B. subtilis*. En revanche, les huiles essentielles de *C.albidus* ont montré une activité vis-à- vis *C. albicans* ATCC 10231 avec un diamètre d'inhibition de $13\pm 0,28$ mm. Aucune activité n'a été observée contre les levures pour les huiles essentielles de *C.ladaniferus* et *C. monspeliensis*. Il semble que l'activité des huiles essentielles de *C. monspeliensis* par rapport aux autres huiles est due à sa composition chimique variée en composés oxygénés appartenant à différentes classes chimiques. Les phénols, les alcools et les aldéhydes présents dans les huiles essentielles sont connues d'avoir des activités antimicrobiennes.

Conclusion Générale

Les résultats obtenus permettent de dire que les huiles essentielles des trois espèces de cistes possèdent une activité antimicrobienne qui pourrait présenter une bonne alternative pour la lutte contre les infections dues aux germes pathogènes.

Les résultats de l'activité antidiabétique *in vitro* indiquent que les huiles essentielles de *C.ladaniferus* inhibent d'une façon significative l'activité de l' α -amylase pancréatique, que celles de *C.albidus* et *C.monspeliensis*. En effet, l'activité exprimée en CI_{50} est de (3,31mg/mL) pour *C.ladaniferus* (3,83 mg/mL) pour *C.albidus* et (4,67 mg/mL) pour *C.monspeliensis*. L'acarbose, molécule de référence, manifeste la plus grande activité avec une CI_{50} de 0,024 mg/mL. Néanmoins, d'autres études sont indispensables pour développer une thérapie antidiabétique en utilisant des inhibiteurs α -amylase d'origine végétale, des recherches *in vivo* seront nécessaires pour valider les résultats *in vitro* obtenus.

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation de la partie aérienne de *C.ladaniferus*, *C. albidus* et *C.monspeliensis* ont été testées à différentes doses sur les insectes adultes de *C.maculatus*. Les huiles essentielles de *C.albidus* sont les plus toxiques, les DL_{50} et DL_{90} (5 μ L/ 10 g de graines) et (12 μ L/10g de graines) respectivement. Cette toxicité s'est présentée bien supérieure à celle de l'insecticide chimique, les DL_{50} et DL_{90} sont (9 μ L/ 10 g de graines) et (33 μ L/10g de graines) respectivement. Les huiles essentielles de *C.ladaniferus* présentent une toxicité un peu variable (DL_{50} = 13 μ L/10g de graines et DL_{90} = 179 μ L/10g de graines), alors que les huiles essentielles de *C.monspeliensis* sont les moins toxiques (DL_{50} = 49 μ L/10g de graines, 780 μ L/10g de graines). D'autre part, l'analyse de l'effet de la durée de l'exposition des insectes aux huiles essentielles a montré que le pourcentage de mortalité augmente d'un jour à un autre (24h et 48h).

L'analyse du profil chimique des huiles essentielles, divulgue la présence des composés connus pour leurs propriétés insecticides comme les monoterpènes et sesquiterpènes.

Cette étude reste préliminaire, il serait beaucoup plus intéressant de compléter ce travail pour mettre en place un moyen de lutte biologique à base des huiles essentielles des cistes, qui se sont révélées efficaces.

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les huiles essentielles de la partie aérienne de *C.ladaniferus*, *C.albidus*, *C. monspeliensis* présentent des activités biologiques intéressantes. A l'avenir, il serait intéressant de poursuivre, d'élargir d'approfondir l'étude de l'efficacité des huiles essentielles des trois espèces de cistes afin d'explorer les huiles essentielles par des études *in vivo* pour leur utilisation dans la conservation et/ou la prolongation de la durée

Conclusion Générale

de conservation des aliments et pour les exploiter dans le domaine pharmaceutique en tant qu'agents antimicrobiens et antidiabétiques.

Nous espérons :

- ✓ Tester d'autres activités biologiques telles que l'activité anti-inflammatoire, l'activité α -glucosidase, etc.
- ✓ Poursuivre notre investigation sur d'autres espèces de cystes.
- ✓ Etendre l'étude de l'activité insecticide vers d'autres légumineuses et sur d'autres espèces d'insectes ravageurs.

ملخص:

مخبر المواد الطبيعية و الفعالة التابع لجامعة تلمسان يهتم منذ عشرة أعوام باستخلاص و تحديد الجزيئات الفعالة بيولوجيا خصوصا الزيوت الطيارة المعروفة ب خواصها العلاجية و كذا إستعمالها في عدة قطاعات. هذا العمل هو مشاركة في دراسة و تثمين بعض النباتات الطبية العطرية المتواجدة في شمال غرب الجزائر. لقد إهتمنا بدراسة: *Cistus ladaniferus* ، *Cistus albidus* و *Cistus monspeliensis*. دراسة هذه النباتات تمت على أساس علمي معمق يهدف للتحليل الكيميائي للزيوت العطرية الطيارة المستخرجة من القسم العلوي للنباتات الثلاث وكذا تثمينها بدراسة بيولوجية. النتائج المتحصل عليها تعد بإستعمال هذه النباتات كمضادات للبكتيريا، للأكسدة، للسكري وكمبيدات حيوية للحشرات.

الكلمات المفتاحية: الزيوت العطرية الطيارة، CPG ، CPG/SM ، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للجراثيم، نشاط مثبط لأنزيم الفا أميلاز، نشاط مبيد للحشرات.

Résumé

Le laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO) de l'université de Tlemcen s'intéresse depuis une décennie à l'extraction et à la caractérisation des molécules bioactives notamment les huiles essentielles connues pour leurs vertus thérapeutiques et leurs utilisations dans plusieurs secteurs d'activités.

Ce travail est une contribution à la valorisation de quelques plantes médicinales et aromatiques du Nord-Ouest de l'Algérie. Il s'agit de *Cistus ladaniferus*, *Cistus albidus* et *Cistus monspeliensis*.

L'investigation de ces espèces a été menée par une étude scientifique rationnelle visant l'analyse chimique des huiles essentielles de la partie aérienne des trois cistes et par la suite valoriser l'extrait aromatique par une étude biologique. Les résultats obtenues sont prometteurs pour l'utilisation de ces espèces comme agents antimicrobiens, antioxydants, antidiabétique et comme biopesticides.

Mots clés : Huiles essentielles, CPG et CPG/SM, activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité inhibitrice *in vitro* de l' α - amylase, activité insecticide.

Abstract

The laboratory of natural and bioactive substances (LASNABIO) of the University of Tlemcen has been interested for a decade in the extraction and characterization of bioactive molecules including essential oils known for their therapeutic virtues and their uses in several sectors.

This work is a contribution to the valorization of some medicinal plants of North-West of Algeria. These are: *Cistus ladaniferus*, *Cistus albidus* and *Cistus monspeliensis*.

The investigation of these species was conducted by a rational scientific study aimed the chemical analysis of the essential oils of the aerial part of the three species and subsequently valorize the aromatic extract by a biological study. The results obtained are promising for the use of these species as antimicrobial agents, antioxidants, antidiabetics and as biopesticides.

Key words: Essential oils, GC and GC / MS, antioxidant activity, antimicrobial activity, *in vitro* α -amylase inhibitory activity, insecticidal activity