



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

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN

THÈSE LMD

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de:

DOCTORAT

Spécialité: Chimie bio-organique et thérapeutique

Par:

M^{elle} MAMI Rihab Imane

Sur le thème

Valorisation chimique et biologique de quelques plantes appartenant à la famille des Astéracées poussant à l'état sauvage

Soutenue publiquement le 29/05/2021 à Tlemcen devant le jury composé de:

M ^r ARRAR Zoheir	Professeur	Université de Tlemcen	Président
M ^r CHOUKCHOU BRAHAM Nouredine	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
M ^r BOUSALEM Smain	Professeur	Université de AinTemouchent	Examineur
M ^{me} AIN SEBAA Nabila	MCA	C. U de Maghnia	Examinatrice
M ^r DIB Mohammed El Amine	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
M ^{me} TABET ZATLA Amina	MCA	Université de Tlemcen	Co-Directrice de thèse

*Laboratoire COSNA
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

À ma famille

En signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour le dévouement, encouragement et les sacrifices dont vous avez fait toujours preuve à mon égard. Sachez que l'amour que vous me donnez continue de m'animer et me permet d'envisager l'avenir comme un défi.

Avant-propos

Avant tout, je voudrais remercier Dieu, le tout-puissant et le miséricordieux, de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde fascinant de la science, la volonté et la patience pour accomplir ce travail.

Le succès de cette thèse dépend en grande partie, hormis mes efforts, des encouragements et des directives de beaucoup d'autres. Je profite de cette occasion pour exprimer ma gratitude aux personnes qui ont contribué à la réussite de cette thèse.

Ce travail a été financé par la Direction générale de la recherche scientifique et développement technologique (**DGRSDT**), à laquelle s'adresse ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le professeur **DIB Mohammed El Amine** qui m'a fait découvrir le monde des substances naturelles. Je ne saurais trop le remercier pour son soutien, son aide et sa patience. Les conseils qu'il m'a prodigués au cours de mes recherches doctorales ces dernières années m'ont constamment incité à rester concentré sur la réalisation de mon objectif. Sa vision intégrale de la recherche et sa mission de fournir un travail de haute qualité, m'ont profondément impressionné. Sans ses encouragements et ses conseils, cette thèse ne se sera pas concrétisée.

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance à Madame **TABET ZATLA Amina**, co-directrice de thèse, pour ses conseils et ses connaissances scientifiques ainsi que pour ses nombreuses discussions et suggestions perspicaces. Je lui suis également reconnaissante pour l'excellent exemple de motivation et enthousiasme qui m'a aidé à réaliser cette thèse.

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé en partie au laboratoire de chimie organique, substance naturelle et analyses (**COSNA**) de la faculté des sciences, Département de chimie, de l'université Aboubekr Belkaid Tlemcen (UABT) sous la direction de Messieurs les professeurs **J. Kajima mulengi** et **Z. Arrar**.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame **W. Drici**, Messieurs **Z. Arrar** et **D. Bendiabdellah** de leurs disponibilités et leurs conseils précieux.

L'hémisynthèse et les analyses spectroscopiques ont été réalisées à la faculté des sciences pharmaceutique et biologique de l'Université Paris Descartes dans l'équipe de synthèse et méthode, sous la direction du **Pr Janick Ardisson** qui je remercie de m'avoir accepté dans son équipe pour effectuer mon stage et de débloquer une grande partie de la thèse.

Je suis reconnaissante à **Joëlle Perard** qui a été ma principale source d'information pour obtenir des réponses à mes questions scientifiques. Mes remerciements vont aussi à **Karim** et **Anabelle** pour leur contribution en termes de temps et d'idées.

La modélisation moléculaire et les spectre IR ont été effectués au laboratoire substances naturelles et bioactives (**LASNABIO**) de la faculté des sciences, Département de chimie, de l'université Aboubekr Belkaid Tlemcen (UABT) sous la direction du Pr **S. Ghalem** .

Je suis redevable au Pr **Ghalem.S** de m'avoir ouvert la porte de son laboratoire pour apprendre plus et au Docteur **Missoum.N** d'avoir consacré du temps pour me former en modélisation moléculaire et m'initier à un domaine dont j'ignorais l'existence.

J'exprime ma profonde reconnaissance au Pr **Z. Arrar**, qui m'a fait l'honneur de présider le jury. Mes vifs remerciements sont adressés à tous les membres de jury : Dr **N. Aïn Sebaa**, Pr **N. Choukchou Braham** et Pr **S.Bousalem** qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Mes remerciements vont également à tous les enseignants du département de chimie.

Je remercie en particulier les ingénieurs du laboratoire, **Kheira** et **Boumediene** pour leur disponibilité et professionnalisme

Je tiens à remercier mes collègues, **R. Belabess**, **F. Benomari** et **F.Benyoucef** qui m'ont aidée à mener à bien mon travail en échangeant des idées intéressantes et en partageant leur expérience.

Je tiens à remercier mes amies : **Imane**, **Nadjiya**, **Samia** et **Wafaa** qui ont montré leur appréciation, m'ont motivé à poursuivre mon travail, pour leur soutien moral, leur présence dans tous les moments dure et pour tous les moments agréables et sympathiques qu'on a passé ensemble.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour tout son amour et ses encouragements. Un grand merci à mes parents qui m'ont élevé avec l'amour de la science et m'ont soutenu dans toutes mes activités, qui m'ont inspiré et encouragé. Pour mes frères et sœurs qui ont toujours su trouver les mots juste pour me redonner le sourire et le courage.

Ce travail n'aurait pas pu aller aussi loin sans le soutien des personnes que j'ai mentionnées précédemment. Je vous suis redevable à tous. J'espère que ce modeste travail aura un impact significatif en inspirant quelqu'un d'autre à poursuivre mes recherches.

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	I
LISTE DES FIGURES.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES SCHÉMAS.....	IV
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	
I. LES SUBSTANCES NATURELLES.....	3
II. LA FAMILLE DES ASTÉRACÉES.....	5
III. MÉTABOLITES SECONDAIRES.....	7
IV. LES HUILES ESSENTIELLES.....	9
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	
I. EXTRACTION, PURIFICATION ET IDENTIFICATION.....	21
II. ÉTUDE STATISTIQUE.....	23
III. HÉMISYNTÈSE DE QUELQUES ANALOGUES DE CARLINA OXYDE.....	24
IV. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE.....	32
V. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE.....	35
VI. ÉTUDE IN-SILICO DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE CARLINA OXYDE ET SES ANALOGUES.....	37
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	
I. <i>CARTHAMUS CAERULEUS</i>	42
II. <i>ANACYCLUS VALENTINUS</i>	61
III. <i>CHRYSANTHÈMUM CORONARIUM</i>	69
IV. <i>AMMOIDES VERTICILLATA</i>	76
CHAPITRE IV: ACTIVITÉS BIOLOGIQUES.....	
I. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE.....	78
II. ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE.....	87
III. ÉTUDE IN-SILICO DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE.....	93
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	97
RÉFÉRENCES.....	99
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	107

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composantes Principales

BHT : Hydroxytoluène butylé

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

DCM : Dichloromethane

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

HE : Huile essentielle

HY : Hydrolat

PDA : Gélose dextrosée à la pomme de terre

DHFR : Dihydrofolate réductase

MSPeB : Mature Streptococcal Cysteine Protease ...

VDW : Van Der Waals

ALA : Alanine

THR : Thryptophane

GLY : Glycine

SER : Sérine

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

Liste des figures

Figure 1 : Illustration de la synthèse et hémisynthèse du taxol et son analogue	5
Figure 2 : Illustrations d'un montage d'hydrodistillation utilisé en laboratoire.....	12
Figure 3: Modèle simplifié d'enzymes et de site actif isolé.....	40
Figure 4: Illustrations <i>Carthamus caeruleus</i>	42
Figure 5: carlina oxyde selon SEMMLER et Gilman	43
Figure 6: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) du mélange IM2/B-P2.....	49
Figure 7 : Spectre IR (KBr, cm ⁻¹) du mélange IM2/B-P2	49
Figure 8: Chromatogramme et spectre de masse du mélange IM12/B-P	49
Figure 9: Spectre IR (KBr, cm ⁻¹) du mélange IM8/B-P8	52
Figure 10: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) du mélange IM8/B-P8	53
Figure 11: Spectre IR (KBr, cm ⁻¹) du mélange IM9/B-P9	54
Figure 12: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) du mélange IM9/B-P9	54
Figure 13: Spectre IR (KBr, cm ⁻¹) du mélange IM10/B-P10	55
Figure 14: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300MHz) du mélange IM10/B-P10	55
Figure 15: Spectre IR (KBr, cm ⁻¹) du mélange IM11/B-P11	56
Figure 16: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) du mélange IM13/B-P13	56
Figure 17: Spectre IR (KBr, cm ⁻¹) du mélange IM12/B-P12	57
Figure 18: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300MHZ) du mélange IM12/B-P12.....	58
Figure 19: Chromatogramme et spectre de masse du mélange IM12 et B-P12	58
Figure 20: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) du cyanoacetate de methyl.....	59
Figure 21: Spectre IR (KBr, cm ⁻¹) du mélange IM12/B-P12	60
Figure 22: Spectre RMN 1H (CDCl ₃ , 300 MHz) du mélange IM13/B-P13	61
Figure 23: Illustration <i>A. valentinus</i>	62
Figure 24: CHA des compositions chimiques de l'huile essentielle de <i>A. valentinus</i>	67
Figure 25: ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de <i>A. valentinus</i>	68
Figure 26: Illustration <i>C. coronarium</i>	70
Figure 27: Dérivés de l'acide caféoylquinique présents dans l'extrait de <i>C.coronarium</i>	71
Figure 28: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de <i>C. caeruleus</i> (HE), de l'extrait d'hydrolat (HY) et de l'oxyde de carlina	80
Figure 29: Pouvoir réducteur de carlina oxyde et ses analoges.....	80
Figure 30: Pouvoir réducteur de l'huile d' <i>A. valentinus</i> et sa fraction oxygénée.....	85
Figure 31: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de <i>C. coronarium</i> et sa fraction oxygénée.....	85
Figure 32: Pouvoir réducteur des huiles en combinaison (1:1) et leurs fractions oxygénées en combinaison (1:1).....	86
Figure 33: Effet synergique de la combinaison des huiles essentielles d' <i>A. valentinus</i> et <i>C. coronarium</i>	86
Figure 34: Effet antagoniste des fractions oxygénées en combinaison des HE d' <i>A.valentinus</i> et <i>C. coronarium</i>	86
Figure 35: Effet de protection in vivo de l'huile essentielle et de l'oxyde de carlina contre l'infection de la pomme causée par <i>P. expansum</i>	89
Figure 36: Effet protecteur des pomme contre <i>P. expansum</i>	91
Figure 37: Effet protecteur des poire contre <i>P. expansum</i>	91
Figure 38: Effet préventif des pomme	92
Figure 39: Effet préventif des poires	93
Figure 40: Diagrammes des interactions (mSPeB-ligands).....	94
Figure 41: Diagrammes des interactions (DHFR-ligands).....	95
Figure 42: Diagrammes des interactions (ADNgyrase-ligands)	96

Liste des tableaux

Tableau 1: Données relatives aux lieux de récolte de <i>A. verticillata</i>	22
Tableau 2: Propriétés des ligands et minimisation de l'énergie de l'oxyde de carlina et des analogues synthétisés	41
Tableau 3: Activités biologiques des plantes comportant carlina oxyde majoritairement	44
Tableau 4: Données relatives aux lieux de récolte de <i>C. caeruleus</i> d'Algérie	45
Tableau 5: Composition chimique de l'huile essentielle des racines de <i>C. caeruleus</i>	46
Tableau 6: Composition chimique de l'extrait d'hydrolat (HY)	46
Tableau 7: Données relatives aux lieux de récolte de <i>A. valentinus</i>	63
Tableau 8: Composition chimique des huiles essentielles de <i>A. valentinus</i> des divers sites de récolte	65
Tableau 9: Composition chimique de la fraction oxygénée de HE d' <i>A. valentinus</i>	68
Tableau 10: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C. coronarium</i>	72
Tableau 11: Composition chimique de la fraction polaire de l'huile essentielle de <i>C. coronarium</i>	75
Tableau 12: Variabilité chimique de l'huile essentielle de <i>A. verticillata</i>	77
Tableau 13: % d'inhibition du DPPH• de HE de <i>C. caeruleus</i> , l'extrait d'hydrolat, carlina oxyde, les analogues, et le BHT a différentes concentrations.	79
Tableau 14: % d'inhibition du DPPH• et test blanchiment au β -carotène de l'HE de <i>A. verticillata</i> et <i>C. caeruleus</i> collectif (individuelles et en combinaison)	81
Tableau 15: Activité antioxydante d'huiles essentielles individuelles (riches en thymol et en oxyde de carlina) et en combinaison	82
Tableau 16: Activité antioxydante d'huiles essentielles individuelles (riches en carvacrol et en oxyde de carlina) et en combinaison	82
Tableau 17: % d'inhibition du DPPH• de HE de <i>A. valentinus</i> , <i>C. coronarium</i> et leur fractions oxygénées (individuelle et en combinaison)	84
Tableau 18: Activité antifongique in vitro contre les champignons phytopathogènes.:	87
Tableau 19: Effet protecteur de l'huile essentielle et de l'oxyde de carlina contre l'infection des pommes causée par <i>P. expansum</i>	88
Tableau 20: Effet de fumigation de l'huile essentielle et de l'oxyde de carlina contre <i>B. oleae</i> après 24 heures d'exposition	90
Tableau 21: Bilan énergétique des différents complexes (enzyme-ligand) Kcal/mol	94

Liste des schémas

Schéma 1: Chemin réactionnel proposé de l'hémisynthèse d'un analogue de carlina oxyde	24
Schéma 2: Nitration de carlina oxyde méthode 1	25
Schéma 3: Nitration de carlina oxyde méthode 2	25
Schéma 4: Chemin réactionnel pour l'hémisynthèse d'un analogue de carlina oxyde.....	26
Schéma 5: Formylation de vilsmeier-Haack	27
Schéma 6: Réduction d'IM 2.....	27
Schéma 7: Protection du groupement hydroxyle par tosylation	28
Schéma 8: Hémisynthèse de l'analogue IM5	29
Schéma 9: Hémisynthèse des analogues IM 6 et IM 7	29
Schéma 10: Hémisynthèse de l'analogue IM 8 -IM 11	30
Schéma 11: Hémisynthèse de l'analogue IM 12	31
Schéma 12: Estérification de l'acide cyano-acétique	31
Schéma 13: Hémisynthèse de l'analogue IM13	32
Schéma 14: Approche synthétique proposé par A.S.Pfau et al(1935).....	44
Schéma 15: Approche synthétique proposé par R.E. Atkinson (1967)	44
Schéma 16: Produits obtenus par formylation de Vilsmeier-Haack.....	47
Schéma 17: Mécanisme réactionnel de la formylation de Vilsmeier-Haack.....	48
Schéma 18: Essais d'hémisynthèse de quelques analogues de carlina oxyde.....	50
Schéma 19: Sous-produits de l'amination reductrice.....	51
Schéma 20: Mécanisme réactionnel de la formation des produits de l'amination reductrice	51
Schéma 21: Mécanisme réactionnel de la formation du l'analogue IM13	59
Schéma 22: Produits formés par condensation de Knoevenagel	59
Schéma 23: Mécanisme réactionnel de la formation du sous-produit B-P13	60

Introduction

Introduction

La nature regorge d'un riche patrimoine potentiel de produit naturel bioactif avec un large éventail d'application. Depuis des siècles, la curiosité de l'homme à propos des goûts, des odeurs et des remèdes aux maladies l'a poussée à utiliser les produits naturels ; ce qui est devenu un centre de préoccupation de la communauté scientifique en raison des preuves croissantes en les associant à leur utilisation efficace et bénéfique, soit comme source thérapeutique contre certaines pathologies, soit comme un complément chimiopréventif, antioxydant, nutraceutique ou diététique. Leur importance s'est accrue également en raison des effets négatifs des médicaments et additifs synthétiques [1].

Dans plusieurs applications, les consommateurs exigent la substitution de composés chimiques par des composés naturels, car il existe une croyance populaire selon laquelle tout ce qui est naturel est bon. Les tisanes sont utilisées depuis longtemps. Non seulement elles ont une grande valeur nutritionnelle et une excellente valeur pour la santé, mais elles peuvent aussi constituer un excellent choix pour les personnes qui recherchent un bien-être général. Sans aucun doute, la prise de conscience des consommateurs, les exigences de qualité croissante et les réglementations plus strictes conduisent à la consolidation des produits naturels dans le cadre des processus de production de plusieurs branches industrielles [2].

Le travail présent regroupe plusieurs axes de la chimie et de la biologie, en vue de valoriser quelques plantes de la famille des astéracées (*Carthamus caeruleus*, *Anacyclus valentinus*, et *Chrysanthemum coronarium*), notamment une extraction suivie par l'étude de la variabilité chimique, de l'hémisynthèse, la modélisation moléculaire et l'étude des activités biologiques.

Une continuité du travail effectué par Dr BELABBES Rania [3]; consiste à réaliser une étude de variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle de *Carthamus caeruleus* de la région de Tlemcen, suivie d'une purification du composé majoritaire de cette huile. Afin d'accéder à de nouvelles molécules thérapeutiques, une série d'analogues du composé majoritaire préalablement isolé a été proposée et préparée par hémisynthèse. Des études biologiques ont été réalisées sur l'huile essentielle, l'hydrolat, le composé majoritaire et ses analogues notamment l'activité antioxydante *in vitro* et antimicrobienne *in silico*.

Une autre étude a été réalisée à la suite des travaux menés par Dr BENYOUCEF Fatima ; comprend l'étude de l'effet synergique et antagoniste de l'activité antioxydante de l'HE de *carthamus caeruleus* et de *Amoides verticillata* et de leurs composés majoritaires individuellement et en combinaison.

Concernant la valorisation de *Anacyclus valentinus*, des études de variabilité chimique sur l'huile essentielle de la partie aérienne de la plante de la région de Tlemcen, de l'activité antioxydante de l'HE et sa fraction oxygénée, et de l'activité antifongique *in vivo* de l'HE ont été élaborées.

D'autre part, *Chrysanthemum coronarium* est une plante qui a fait l'objet de nombreuses études scientifiques ; ceci nous a incités à étudier la composition chimique, les activités antioxydantes *in vitro* et antifongiques *in vivo* de son huile essentielle ainsi que de sa fraction oxygénée.

La dernière partie de ce travail été consacrée à l'étude de l'effet synergique de l'activité antioxydante et antifongique des huiles essentielles de *Chrysanthemum coronarium* et *Anacyclus valentinus* en combinaison et de leurs fractions oxygénées.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Les Substances naturelles

1. Généralités

Le succès des produits à base de plante tel que le paclitaxel en traitement des tumeurs, et l'artémisinine dans le traitement du paludisme a donné l'impulsion pour l'introduction de nombreuses recherches notamment dans l'industrie [1]. Des efforts considérables sont déployés par la génération de nouvelles molécules « chef de file » d'origine végétale, marine, microbienne... grâce à l'utilisation de protocole de criblage adéquat. Lorsque des résultats intéressants sont aperçus, il est indispensable de disposer des méthodes permettant d'isoler rapidement et efficacement le composé ciblé [4].

Un produit naturel est une substance ou un composé chimique produit par un organisme vivant présent dans la nature ayant généralement une activité pharmacologique ou biologique. Certains de ces agents sont des dérivés de plante terrestre, tandis que d'autres sont obtenus à partir de micro-organisme, d'organisme marin ou d'eau douce ou même des animaux [5].

La biodiversité algérienne (naturelle et agricole) est extrêmement riche grâce à l'emplacement géographique et la diversité bioclimatique du pays (zones humides, subhumides dans le nord tellien, semi-aride à aride dans sa partie médiane et saharienne dans le sud). On compte 3139 espèces dont 15 % sont endémiques. En Algérie, les plantes médicinales et aromatiques sont un héritage familial oral, particulièrement prédominant chez les femmes âgées et analphabètes. Il s'agit de compétences patrimoniales transmises de génération en génération au sein des populations, le plus souvent paysannes [6,7].

Compte tenu de sa richesse naturelle et culturelle et du contexte socio-économique, cette région est un lieu idéal pour l'étude des plantes aromatiques et médicinales et de leurs utilisations traditionnelles.

2. Synthèse des produits naturels : défis et progrès

Au cours de la première partie du 20^e siècle, la synthèse totale a joué un rôle central dans l'identification et la confirmation de la structure du principe actif d'un extrait brut provenant de sources naturelles [8]. Toutefois, grâce au développement de techniques modernes d'analyse et de purification et de méthodes spectroscopiques, les structures de la plupart des produits naturels peuvent désormais être déterminées sans ambiguïté. Néanmoins, la synthèse totale reste la preuve ultime de la structure des produits naturels complexes, en particulier la stéréochimie absolue ou la stéréochimie relative. De nombreux produits actifs naturels ayant une activité biologique prometteuse sont structurellement trop complexes pour être facilement synthétisés de manière rentable par synthèse totale à partir de matériaux disponibles dans le

commerce [9]. La synthèse des produits naturels est encore loin d'être "idéale". Un examen historique des progrès de la synthèse des produits naturels révèle que les procédures par étapes et les longues stratégies de protection des groupes diminuent considérablement l'efficacité de la synthèse. Ces dernières années, la communauté de la chimie organique a intégré les principes fondamentaux qui sous-tendent l'efficacité remarquable de la biosynthèse dans ses approches synthétiques afin de remédier à ces inconvénients et de parvenir à une production de produits naturels évolutive. Ces nouveaux concepts et stratégies comprennent l'économie des atomes, des étapes et de l'oxydoréduction, la synthèse sans groupe protecteur et la synthèse biomimétique [10].

L'hémisynthèse, d'autre part, a joué un rôle majeur dans le développement et la production de médicaments dérivés de produits naturels [11]. Par exemple, l'isolement du paclitaxel dans la nature n'a pas produit suffisamment de matériel pour les essais cliniques. De plus, aux premiers stades de son utilisation clinique, 130 kg de Taxol ont été extraits de 1000 tonnes d'écorce, ce qui a nécessité l'abattage de plus de 500 000 ifs du Pacifique, ceci était une grande préoccupation environnementale. L'hémisynthèse en quatre étapes du paclitaxel à partir de la 10-désacétylbaccatine III a grandement facilité le développement du Taxol. La 10-désacétylbaccatine III a été trouvée dans les aiguilles de l'if européen commun *T. baccata* ainsi que dans une espèce d'if trouvée en Inde. En récoltant et en extrayant les aiguilles, la baccatine III ou la 10-désacétylbaccatine III peut être fournie en grande quantité comme précurseur du paclitaxel sans causer des dommages importants aux populations d'arbres [12]. En plus du paclitaxel, des analogues tels que le docétaxel (Taxotere®) ont été synthétisés avec un rendement suffisant par hémisynthèse [13]. Par rapport au paclitaxel, le docétaxel hémisynthétique a une meilleure solubilité dans l'eau et est utilisé cliniquement contre le cancer du sein et des ovaires [9,12]. Six groupes ont réalisé la synthèse totale du paclitaxel entre 1994 et 2002. Toutefois, aucune de leurs méthodes n'est comparable à la semi-synthèse en termes de coût de production à grande échelle (**Figure 1**) [10].

Par conséquent, en choisissant la bonne cible et en utilisant une technologie de synthèse à la fois efficace et innovante, il ne fait aucun doute que la synthèse de produits naturels restera non seulement pertinente, mais aussi essentielle pour faire progresser la découverte de médicaments et le domaine de la biochimie.

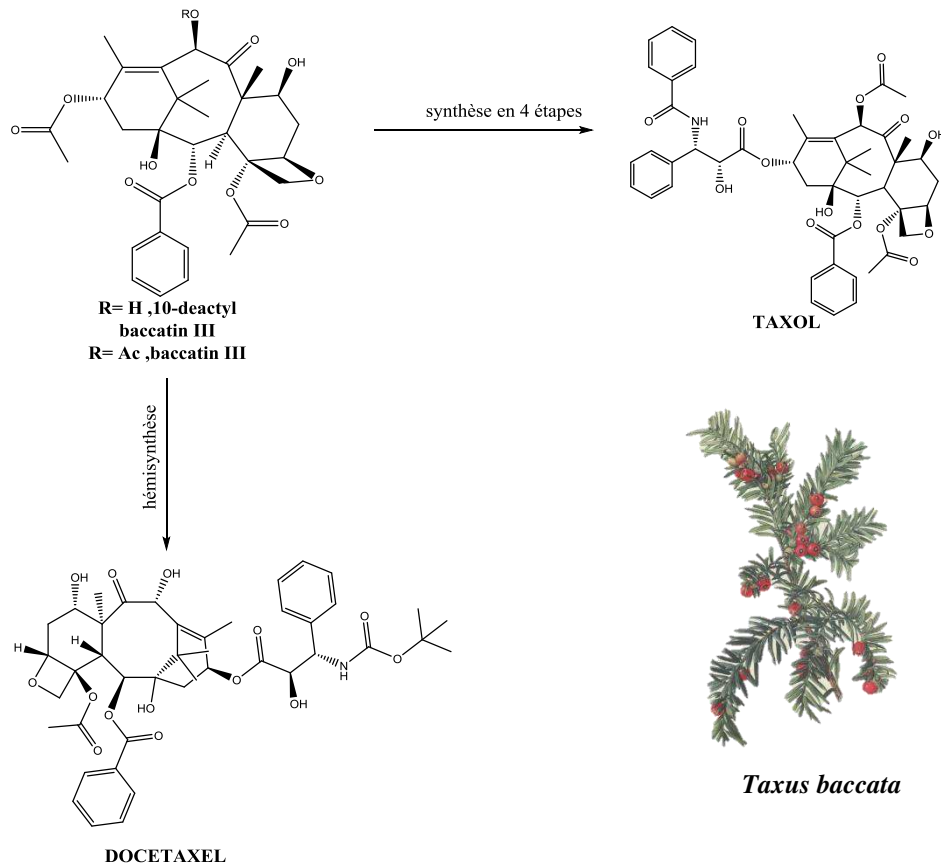


Figure 1 : Illustration de la synthèse et hémisynthèse du taxol et son analogue

II. La famille des astéracées

1. Généralités

La famille des astéracées est une famille archaïque et la plus importante des angiospermes ; elle tient son importance de sa façon d'évolution et de multiplications. Ceci est traduit par son organisation biologiquement réussie qui a permis à la nature de multiplier un très grand nombre de spécimens. En effet, elle comporte plus de 23 500 espèces. Cette famille a été décrite en 1792 par Paul Dietrich Giseke [15]. Les Asteracées sont l'une des plus grandes familles de fleurs avec une distribution mondiale à l'exception de l'Antarctique, mais la famille est beaucoup plus diversifiée dans les régions tropicales et subtropicales de l'Amérique du Nord, les Andes, l'est du Brésil, l'Afrique australe, la région méditerranéenne, l'Asie centrale et le sud-ouest de la Chine. Selon l'origine, les astéracées sont les deuxièmes plus grandes en taille après les orchidées. Une certaine confusion est due au fait qu'il est très difficile de savoir avec certitude combien il y a d'espèces dans chaque famille [16].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Il existe de nombreuses espèces dans cette grande famille ; elles sont réparties en 13 sous-familles ayant chacune leurs propres caractéristiques déterminantes [15-17] :

- Les *Barnadésioïdées* et *Mutisioïdées* sont des arbustes ou des plantes herbacées poussant principalement en Amérique du Sud, lieu probable de l'émergence de la famille au début de l'ère tertiaire, il s'agit de formes archaïques d'astéracées.
- Les *Carduoïdées* possèdent des fleurs typiquement roses, bleues ou pourpres, toutes en tube, comme celles du capitule du bleuet, les chardons, les cirses et beaucoup d'astéracées épineuses méditerranéennes se retrouvent dans cette sous-famille. En pharmacie, l'Artichaut et la Bardane et le Chardon-Marie sont bien connus pour leurs vertus hépatiques ou dépuratives.
- Les *Cichorioïdées* correspondent à des Astéracées à latex, dont le nom est évoqué dans les noms comme lactuca, laitue, laiteron. C'est lui qui donne un goût amer aux chicorées et aux endives. En pharmacie, on utilise le Pissenlit et la Piloselle pour leur action diurétique et dépurative. Des légumes tels que le Salsifis, la Scorzonère appartiennent à ce groupe : leur inuline permet des régimes sans amidon chez les patients intolérants.
- Les *Famatinanthoïdées* : cette sous-famille ne contient qu'une seule espèce endémique au nord-ouest de l'Argentine, *Famatinanthus decussatus* ; un petit arbuste de 50 centimètres à 1,50 mètre de haut.
- Les *Stiffioïdées* : comprend 5 tribus qui se trouvent principalement dans la forêt tropicale du Brésil.
- Les *Wunderlichioïdées* : La répartition géographique des membres de la sous-famille des *Wunderlichioïdées* est parallèle à celle des *Stiffioïdées*, avec trois zones d'endémisme réparties dans toute en Amérique du Sud : une dans les Andes ou l'est tempéré de l'Amérique du Sud, une au centre du Brésil et une dans les hauts plateaux de Guayana. Elle contient 2 tribus contient deux tribus principales : la tribu *Wunderlichioïdées* et la tribu *Hyalidée*.
- Les *Gochmatioïdées* : se trouve dans les régions d'Amérique du Sud, notamment dans les montagnes sableuses du centre du Brésil et dans les forêts humides du nord de l'Argentine et du sud de la Bolivie, cette sous-famille est constituée de 7 tribus.
- Les *Hecastocleidoïdées* : elle est constituée d'un seul genre *Hecastocleidée*, un arbuste endémique des montagnes bordant le désert en Californie et au Nevada.
- Les *Pertyoïdées* : comptent environ 70 espèces limitées à l'Asie orientale tempérée et à l'Himalaya. La plupart des espèces sont des hygrophytes qui vivent dans le sous-étage des forêts de climat tempéré.
- Les *Gymnarrhenioïdées* : cette sous famille ne contient qu'une seule espèce appartient au biome méditerranéen de l'Afrique du Nord et le Moyen-Orient.

- Les *Corymbioïdées* : Le genre anormal *Corymbium* s'est avéré être une lignée distincte reliant les *Cichorioïdées* aux tribus d'*Asteroidées*. Un petit genre de seulement neuf espèces d'herbes vivaces de la région du Cap en Afrique du Sud.
- Les *Astéroïdées*, avec 16 000 espèces, forment l'essentiel des astéracées. Ce groupe se divise en nombreuses tribus dont les plus importantes sont les *Anthémidées*, dont beaucoup présentent des feuilles pennatiséquées odorantes et elles sont connues en pharmacie : l'achillée millefeuille, la tanaïs, les anthémis, les matricaires et camomilles, les pyrèthres comme insecticides ; les Marguerites et Chrysanthèmes sont ornementaux. Les *astérées* comprennent surtout les asters, pâquerettes, verges d'or et vergerettes, celle du Canada étant utilisée en pharmacie ; les *Sénécionées* forment un groupe à part avec l'immense genre Seneçon présenté plus haut et aussi le tussilage utilisé en pharmacie. Les *Hélianthées* sont une tribu surtout américaine ; elles comportent le Tournesol, cultivé pour son huile riche en acides gras insaturés et ses tourteaux, le topinambour, également du genre *Helianthus*, L'Échinacée, aux propriétés immunostimulantes, nous vient de la pharmacopée des Indiens d'Amérique du Nord et différentes plantes ornementales comme les Rudbeckias, les Dahlias, Cosmos et Zinnias. Le guayule, plante mexicaine riche en latex, est une alternative prometteuse au caoutchouc de l'hévéa. Son caractère hypoallergénique se prête à divers emplois. Les galinsoga et les ambrosies sont des adventices invasives d'origine américaine.

2. Étude ethnobotanique

Du point de vue d'ethnobotanique, la famille des astéracées est très utilisée par la population africaine, selon une étude ethnobotanique sur les astéracées dans la région Meknès sur 48 espèces dont les plus citées sont *Anacyclus pyrethrum*, *Dittrichia viscosa* et *Atractylis gummifera*, *Échinops spinosus* et *Calendula officinalis* a révélé que cette famille est utilisée principalement dans le traitement des affections du tube digestif suivi par le traitement des troubles cardiovasculaires et métaboliques [20]. Par ailleurs, la feuille constitue l'organe le plus utilisé et la décoction est le mode de préparation le plus employé pour la majorité des remèdes. Une autre étude menée au Nigeria sur 12 espèces a montré que la population nigérienne utilise cette famille comme condiment, en thérapie et comme carburant [20].

III. Métabolites secondaires

Le règne végétal est la source de divers composés chimiques découverts aujourd'hui. Les plantes produisent une grande variété de composés chimiques communément appelés métabolites secondaires [22].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les métabolites secondaires des plantes ont traditionnellement été perçus comme toxiques et protecteurs contre les prédateurs, ou agissants comme attractifs pour les insectes [23]. Contrairement aux métabolites primaires, ils sont synthétisés dans des types de cellules spécialisées et à des stades de développement distincts, ce qui rend leur extraction et purification plus difficile, par rapport aux métabolites primaires [24]. Ces constituants chimiques sont extrêmement divers. Chaque famille, genre et espèce de plante produit une catégorie chimique caractéristique ou un mélange de celles-ci, et ils peuvent parfois être utilisés comme caractères taxonomiques dans la classification des plantes. Ces composés peuvent être divisés en trois grands groupes, à savoir les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpénoïdes.

- **Les alcaloïdes** sont des composés azotés synthétisés dans les plantes, principalement à partir d'acides aminés. Beaucoup de ces alcaloïdes protègent les plantes contre une variété d'animaux herbivores, tandis que beaucoup d'autres ont des activités pharmacologiques importantes [23].

- **Les composés phénoliques** sont biosynthétisés principalement par la voie de l'acide shikimique et ont une large répartition dans la nature [22]. Les composés phénoliques peuvent être des molécules simples présentes dans les fruits et légumes ou les grands composés complexes présents dans les feuilles, les écorces ou les racines d'une plante. Les composés phénoliques sont composés d'un ou plusieurs cycles benzéniques avec un ou plusieurs des groupes hydroxyles et certaines chaînes latérales. Sur la base de leur squelette de base et du nombre des anneaux de benzène, ainsi que les schémas de liaison, une large classification des phénoliques est faite [24].

- **Les terpènes** est le nom générique d'un groupe de produits naturels, structurellement basé sur les unités isoprène (isopentényle). Le terme peut également désigner les dérivés oxygénés de ces composés, connus sous le nom de terpénoïdes. Ils sont normalement classés en groupes basés sur le nombre d'unités isoprène dont ils sont biogénétiquement dérivés. ; les monoterpènes (ayant deux unités C-5), les sesquiterpènes (ayant trois unités C-5), les diterpène (ayant quatre unités C-5), les sesterpène (ayant cinq unités C-5), les triterpènes (ayant six unités C-5) [25]. Les hydrocarbures terpéniques ne contribuent à l'odeur et au goût des huiles essentielles que de manière limitée, mais leurs dérivés oxygénés comptent parmi les plus importants produits chimiques aromatiques [26,27].

Les diverses applications des terpénoïdes ont été étudiées de manière critique et sont maintenant bien acceptées. Certains d'entre eux comprennent des additifs naturels pour les aliments ou les parfums en parfumerie et dans les médecines traditionnelles et alternatives comme l'aromathérapie [27]. L'effet des terpènes dans la prévention et le traitement du cancer

est le plus étudié [28,29]. Parmi les autres utilisations thérapeutiques importantes des terpénoïdes, on peut citer les antimicrobiens, les antifongiques, les antiviraux, les antihyperglycémiant, les anti-inflammatoires, les antioxydants, les antiparasitaires, les immunomodulateurs et l'amélioration de la perméabilité cutanée [26,30].

IV. Les huiles essentielles

1. Historique

Tout au long de l'histoire, de nombreuses civilisations ont utilisé les huiles essentielles et les parfums à des fins diverses. Ces huiles étaient extraites de plante aromatique. Les anciens Égyptiens utilisaient les huiles essentielles en médecine, en parfumerie, et dans l'art d'embaumer et de préparer les corps pour l'enterrement par momification. Dans l'Asie ancienne, les Védas ont officialisé l'utilisation des parfums et des produits aromatiques à des fins rituelles et thérapeutiques. Les Phéniciens, les Juifs, les Grecs, les Romains et d'autres cultures situées autour du bassin méditerranéen ainsi que les Mayas et les Aztèques en Amérique possédaient tous une culture du parfum d'un grand raffinement [31].

Après la chute de l'Empire romain et avec la venue des civilisations chrétiennes et musulmanes, l'art et la science du parfum ont été introduits dans le monde arabe, où ils ont atteint un haut niveau de développement. Les alchimistes ont tenté de créer l'« élixir de vie » afin de vivre indéfiniment, tandis que les monastères utilisaient les huiles essentielles pour obtenir divers médicaments permettant de guérir différentes maladies ou pour fabriquer des dérivés aromatiques tels que le savon et le parfum [32]. À la Renaissance, l'utilisation des huiles essentielles en parfumerie et en cosmétique a été étendue au monde entier.

2. Généralités

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de composés organiques volatils, généralement de faible poids moléculaire. Elles sont formées par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires, qui sont naturellement synthétisées par les plantes en réponse aux attaques des insectes, des herbivores et d'autres organismes [33]. Les huiles essentielles sont caractérisées par une forte odeur. Elles sont généralement extraites par vapeur ou hydrodistillation. Ce type d'huile peut être produit par tous les organes des plantes (les graines, les fleurs, les feuilles, les bourgeons, les tiges, les fruits, les racines, le bois ou l'écorce) et est stocké dans les conduits d'huile, les conduits de résine, les glandes ou les trichomes des plantes [32].

Les composants des huiles essentielles comprennent les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes, et d'autres composants tels que les constituants aromatiques et

aliphatiques. Dans le groupe des terpènes, on trouve des monoterpènes, des sesquiterpènes et des dérivés oxygénés, tous caractérisés par un faible poids moléculaire. En général, les HES contiennent environ 20 à 60 composants, jusqu'à plus de 100 composants individuels, à des concentrations très différentes ; deux ou trois d'entre eux sont des composants majoritaires à des concentrations assez élevées (20 à 70 %), tandis que d'autres sont présents à l'état de traces [34]. Les principaux composants sont responsables des propriétés biologiques des huiles essentielles, mais il arrive qu'une combinaison de molécules modifie leur activité de manière significative [29,31].

En 2017, une estimation de production mondiale des huiles essentielles est de plus de 150 000 tonnes, soit environ 6 milliards de dollars. Les principaux producteurs, par continent, sont la Chine et l'Inde (Asie), le Maroc et la Tunisie (Afrique), les États-Unis, le Canada, le Mexique (Amérique), et la France et l'Allemagne (Europe). En raison de l'intérêt croissant des consommateurs pour un mode de vie naturel et sain, de l'augmentation des revenus dans les pays en développement du monde et de la connaissance et de l'utilisation accrue des huiles essentielles (aromathérapie, thérapie thermique, etc.) [35]. En Algérie, et malgré l'abondance des plantes médicinales et aromatiques, le secteur de la production des huiles essentielles reste peu développé en raison de leur importation croissante [36].

3. Méthode d'extraction

Il existe diverses méthodes pour l'extraction des huiles essentielles des plantes. Comme les huiles essentielles sont des matières thermosensibles, elles sont insolubles dans l'eau et peuvent se dégrader à leur point d'ébullition [35,36]. Par conséquent, la température de la vapeur ne doit pas être si élevée qu'elle détruise la plante ou brûle l'huile essentielle, mais assez élevée pour produire suffisamment de vapeurs pour la séparation souhaitée de l'huile [39]. Des paramètres tels que le poids de la matière première, le volume du solvant, la taille de la matière première, la température et la durée de l'extraction influencent le rendement en huile essentielle [40].

En revanche, les extraits obtenus par extraction au moyen de différents solvants organiques, de dioxyde de carbone liquide ou par extraction au moyen de fluides supercritiques ne peuvent pas être considérés comme de véritables huiles essentielles [41] ; cependant, ils présentent le plus souvent des profils aromatiques presque identiques à ceux de la matière première dont ils ont été extraits. Ils sont donc souvent utilisés dans l'industrie des arômes et des parfums et en outre dans l'industrie alimentaire, si les solvants choisis sont adaptés aux aliments et ne laissent aucun résidu nocif dans les produits alimentaires [40,41].

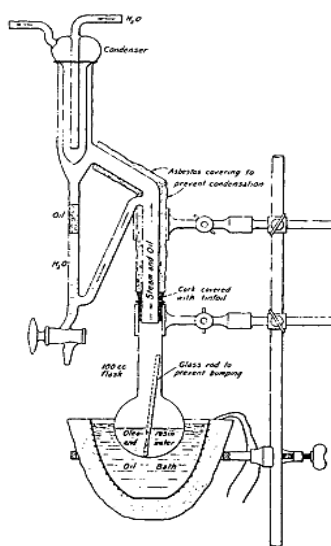
a. Distillation à la vapeur

Le plus souvent, l'essence des plantes est extraite en utilisant une technique appelée distillation. Un type de distillation consiste à placer la plante ou les fleurs sur un tamis. Elle est ensuite soumise à la vapeur d'eau sans macération dans l'eau. La vapeur obtenue passe à travers les plantes de la base de l'alambic jusqu'au sommet [43]. Il s'agit d'une méthode où la vapeur traverse le matériau. Le principe de cette technique est que la pression de vapeur combinée est égale à la pression ambiante à environ 100 °C, de sorte que les composants volatils dont les points d'ébullition sont compris entre 150 et 300 °C peuvent être évaporés à une température proche de celle de l'eau. En outre, cette technique peut également être réalisée sous pression en fonction de la difficulté d'extraction des huiles essentielles [30].

b. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode d'extraction utilisée à la place de la distillation à la vapeur. Ce procédé d'extraction est l'une des méthodes traditionnelles d'extraction les plus utilisées. Dans ce processus, au lieu de faire passer la vapeur par la plante dans l'hydrodistillation, le matériau est trempé dans l'eau. Ensuite, on chauffe le récipient d'eau jusqu'à ce que la vapeur en sorte, puis on le laisse refroidir et on recueille l'échantillon d'huile au sommet de l'hydrolat. L'hydrodistillation est une méthode potentiellement très utile pour extraire l'huile essentielle de diverses plantes et de leurs différentes parties [41]. Le rendement dépend de divers paramètres tels que le poids de la matière première, le volume d'eau, la taille et la nature de la matière première. L'appareil de laboratoire recommandé pour l'hydrodistillation est le système Clevenger qui est composé essentiellement de trois parties : Un ballon à fond rond, dans lequel sont placées la matière première et une quantité d'eau donnée ; un séparateur, dans lequel l'huile est automatiquement séparée du distillat dans un tube gradué, en y permettant une lecture directe de la quantité d'huile ; et un condenseur [44].

Les hydrolats sont l'eau de condensation formée lors de la distillation à la vapeur ou de l'hydrodistillation de matières végétales. La distillation est entreprise pour obtenir les huiles essentielles contenues dans la matière végétale, mais il arrive que la distillation soit entreprise spécifiquement pour produire l'eau végétale qui en résulte. Bien que les hydrolats existent depuis aussi longtemps que la distillation, et qu'ils aient même pu être le produit pour lequel la distillation a été inventée, leur utilisation en aromathérapie est encore assez récente [45].



a. Appareil clevenger (apparatus for the determination of volatile oil J.F Clevenger,1928)



b. Montage hydrodistillation Clevenger (COSNA, 24/05/2017)

Figure 2 : Illustrations d'un montage d'hydrodistillation utilisé en laboratoire

Chaque litre d'hydrolat contient entre 0,05 et 0,2 mL d'huile essentielle dissoute, en fonction de la solubilité dans l'eau des composants de la plante et des paramètres de distillation. Toutefois, l'huile essentielle en solution dans l'hydrolat présente un profil chimique différent de celui de l'huile pure provenant du même procédé, car certains des produits chimiques contenus dans l'huile essentielle sont trop lipophiles pour rester dans l'eau, tandis que d'autres sont trop hydrophiles pour rester dans l'huile [45].

4. Méthode d'identification

L'analyse d'une huile essentielle implique généralement la séparation, l'identification et la détermination quantitative de ses composants. Il s'agit notamment des techniques chromatographiques (chromatographie sur couche mince, chromatographie sur colonne et chromatographie en phase gazeuse) et spectroscopiques (Spectrométrie de masse (SM), spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, spectrophotométrie infrarouge) ou de leur combinaison (chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)).

a. *La chromatographie sur couche mince (CCM)* est une excellente technique d'analyse des extraits végétaux bruts, qui permet d'optimiser le système de solvants pour un problème de séparation donné. L'application très répandue de la CCM est également due au fait qu'il s'agit d'une procédure analytique simple et rapide ; elle est extrêmement flexible, car une grande

variété de phases mobiles et stationnaires et de réactifs de détection peuvent être testés et utilisés pour la résolution de tout problème de séparation [44,45].

b. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la technique la plus importante pour la séparation des constituants des huiles essentielles. Cette technique est basée sur la séparation des composants volatils d'un liquide ou d'un mélange gazeux qui est volatilisé dans une colonne garnie d'une phase liquide adsorbée sous forme de film mince sur un support (phase stationnaire). La phase mobile est constituée d'azote ou d'hélium gazeux qui transportent les composés volatils à travers la colonne. La colonne est placée dans un four où des conditions isocratiques et programmées de température peuvent être obtenues. Les composants d'un mélange sont séparés en raison des différences dans les coefficients de partage desdits composants entre la phase gazeuse et la phase liquide stationnaire. Les composés qui ont moins d'affinité avec la phase stationnaire sont d'abord élués de la colonne [41].

Dans l'analyse de routine par CPG capillaire, une solution d'huile essentielle de 1 à 10 % dans du n-hexane ou de l'éther diéthylique est injectée par une microsiringue. Le rapport de division est normalement décidé après expérimentation. Avant l'avènement des colonnes capillaires, on utilisait des colonnes en métal ou en verre, garnies de matériaux de support solides recouverts d'une phase liquide stationnaire. En raison d'un pouvoir de séparation beaucoup plus élevé dans un temps d'analyse plus court, les colonnes capillaires sont aujourd'hui préférées. Il s'agit de longues colonnes en verre ou en silice fondue (20-60 m) de petit diamètre. Les types de colonnes capillaires les plus populaires sont les suivants : couche poreuse tubulaire ouverte (PLOT) et couche de support tubulaire ouverte (SCOT) où la phase liquide stationnaire est déposée sur des particules de support poreuses et neutres et la colonne capillaire classique ou WCOT où la phase liquide stationnaire est directement déposée à l'intérieur de la paroi de la colonne. Les colonnes WCOT sont de préférence utilisées pour l'analyse des huiles essentielles. Les colonnes à alésage étroit de 0,25-0,32 mm de diamètre intérieur avec une épaisseur de film d'autour de 0,2-0,5 mm sont largement utilisés. D'autre part, les colonnes à large diamètre de 0,5 mm de diamètre intérieur avec des diamètres de 0,3 à 0,5 mm sont préférées pour les injections sans fractionnement (splitless) [37,46].

La volatilité et la polarité des composants des huiles essentielles font de la chromatographie en phase gazeuse capillaire la technique de choix pour leur analyse, car les Huiles essentielles en général sont des mélanges complexes de composants ayant des caractéristiques physico-chimiques similaires. Une séparation exhaustive des huiles essentielles peut de préférence être obtenue en combinant deux phases stationnaires de polarité différente. L'identification est généralement effectuée soit par des données chromatographiques (indices

de Kováts, indices de rétention linéaire, temps de rétention relatif), mesurables avec un détecteur universel tel que le FID, soit par des données spectrales, principalement par spectrométrie de masse (CPG-SM) [48].

c. La Chromatographie sur colonne est la méthode la plus courante de fractionnement des huiles essentielles et la séparation de leurs hydrocarbures et des composants oxygénés. Les hydrocarbures sont séparés sur du gel de silice par élution avec du pentane ou de l'hexane [49]. Cependant, certains des composés réactifs présents dans les huiles essentielles ont tendance à s'isomériser lorsqu'ils sont adsorbés sur le gel de silice [50]. Ce phénomène peut être évité ou minimisé en maintenant la température de la colonne basse, en utilisant un adsorbant dépourvu d'impuretés métalliques à l'état de traces, et en adsorbant l'huile sur des colonnes déjà mouillées par le solvant de développement, ou en le désactivant par l'ajout de 5 à 7 % d'eau. Après désorption des composants non polaires de la colonne, les composés oxygénés peuvent être élués par ordre croissant de polarité en appliquant un gradient d'élution avec des solvants tels que l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle, les hydrocarbures chlorés et le méthanol dans le pentane ou l'hexane, ce qui donne un certain nombre de fractions, et éventuellement quelques composants purs [49].

d. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) est une technique sophistiquée par laquelle la SM agit comme un détecteur pour les composés séparés par une CPG. Les composés isolés sont illustrés sous la forme d'une série de pics. Les équipements modernes de CPG/SM disposent de bibliothèques informatisées et de systèmes de recherche avancés. Le spectre de masse de chaque composé détecté peut être instantanément pris et examiné à partir de plusieurs milliers de spectres de masse contenus dans des bibliothèques informatisées pour identification [51]. Les données du spectre de masse ne peuvent pas toujours suffire à elles seules pour une identification correcte. Si un composé présente un spectre de masse et des données de rétention identiques à ceux d'un composé connu, ils sont alors considérés comme identiques. Cependant, en cas de doute, la co-injection avec un échantillon standard du composé prévu, ou l'injection de la même huile dans une colonne de polarité différente doit être appliquée. La solution idéale au problème pourrait être l'isolement du composé en quantité suffisante pour effectuer une mesure RMN ou pour compléter l'analyse par des données FT-IR. Dans le cas de nouveaux composés, l'analyse des données de fragmentation donne un indice de sa structure chimique [48].

e. La spectroscopie RMN 13C est généralement utilisée pour l'élucidation des structures moléculaires d'espèces chimiques isolées. De plus, elle permet d'analyser un échantillon d'huile essentielle sans séparation préalable de ses composants [41]. Cependant, l'application

de la spectroscopie RMN ^{13}C à l'analyse d'huiles essentielles et de mélanges complexes similaires offre des avantages particuliers, pour confirmer les résultats d'analyse obtenus par CPG-SM et pour résoudre certains problèmes rencontrés avec des composants de mélanges non volatils ou des composés thermiquement instables, puisque l'analyse est effectuée à température ambiante. L'analyse qualitative d'une huile essentielle est basée sur la comparaison du spectre des huiles, en utilisant le découplage à large bande, avec les spectres des constituants de l'huile pure qui doivent être enregistrés dans des conditions identiques en ce qui concerne le solvant, la température, etc [48]. Avec une analyse minutieuse du spectre, tous les principaux composants d'une huile peuvent être identifiés et même quantifiés.

5. Stabilité des huiles essentielles

En raison de leur relation structurelle au sein d'un même groupe chimique, les composants des huiles essentielles sont connus pour se convertir facilement les uns en les autres par des réactions d'oxydation, d'isomérisation, de cyclisation ou de déshydrogénation, déclenchées soit enzymatiquement soit chimiquement [39]. Ces processus de vieillissement s'accompagnent généralement d'une perte de qualité plus ou moins prononcée. Outre le développement fréquent de saveurs désagréables et souvent piquantes, des changements de couleur ou des changements de consistance jusqu'à la résinification ont été signalés aussi bien lors de la dégradation des huiles essentielles que des terpénoïdes simples. Lors de l'évaluation de la stabilité des huiles essentielles, il faut garder à l'esprit que la composition chimique peut déjà varier dans la matière première, étant influencée par la santé des plantes, le stade de croissance, l'habitat, y compris le climat, les facteurs environnementaux, ainsi que le moment de la récolte [40].

Par exemple, on peut fréquemment rencontrer dans les huiles essentielles stockées l'oxyde de caryophyllène qui est un produit secondaire stable important qui résulte de l'oxydation à l'air du sesquiterpène caryophyllène [52]. En outre, il a été fréquemment signalé que le carveol et son produit d'oxydation, la carvone, résultaient de la réaction des peroxydes au cours de l'auto-oxydation du limonène avec l'oxyde de limonène. D'autre part, certains terpénoïdes oxygénés tels que le menthol, le 1,8-cinéol et la menthone ne formaient pas d'hydroperoxydes lors de l'oxydation, mais étaient directement convertis en cétones, acides, et aldéhydes [53].

Étant donné que les terpénoïdes ont tendance à être à la fois volatils et thermolabiles et qu'ils peuvent être facilement oxydés ou hydrolysés selon leur structure respective, il est bien admis que la composition chimique des huiles essentielles dépend en outre des conditions pendant le traitement et le stockage du matériel végétal, lors de la distillation ainsi que lors de

la manipulation ultérieure de l'huile elle-même. Par conséquent, les facteurs externes tels que la température, la lumière et l'accessibilité à l'oxygène atmosphérique doivent être soigneusement pris en compte [38]. En outre, la composition des huiles essentielles, les structures des composés et la présence d'impuretés peuvent également régir la stabilité.

6. Applications des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs), extraites de plantes aromatiques, sont des produits naturels intéressants et représentent une importante partie de la pharmacopée traditionnelle. L'utilisation de certaines HEs comme agents antimicrobiens et pharmaceutiques alternatifs a suscité un intérêt considérable récemment. La plupart des HEs et leurs constituants uniques ont été signalés comme inhibant plusieurs phytopathogènes, agents pathogènes humains et insectes, ainsi que leurs utilisations efficaces dans les industries alimentaires et pharmaceutiques

a. En Pharmacologie

- **Activité antioxydante** : Les huiles essentielles sont riches en composés phénoliques et c'est pourquoi elles ont fait l'objet de nombreuses recherches pour évaluer leur activité en tant qu'antioxydants ou capteurs de radicaux libres. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent réagir avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques, provoquant un stress oxydatif et des altérations moléculaires liés au cancer, aux maladies cardiovasculaires, le diabète, le vieillissement et les maladies neurodégénératives. Les propriétés de piégeage des radicaux et les propriétés antioxydantes du dosage des radicaux DPPH à température ambiante ont été prouvé pour les huiles essentielles de basilic, cannelle, girofle, noix de muscade, origan, et thym. L'action de l'huile essentielle de citrus limonum Risso pour contrôler la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres et de prévenir les dommages tissulaires de la peau [54].

- **Activité anticancéreuse** : L'activité anticancérigène est la capacité d'une substance spécifique à neutraliser ou d'inhiber complètement le développement d'un agent cancérigène. Le mécanisme général de l'effet cytotoxique de l'huile essentielle de plante est principalement dû à la présence de phénols, d'aldéhydes et d'alcools [55]. En particulier, la toxicité pour les mammifères diminue de manière significative avec l'augmentation de la lipophilie moyenne des composants de l'huile essentielle, tandis que la toxicité pour les bactéries et les champignons augmente simultanément de manière significative avec l'augmentation de la lipophilie [54,55]. Ce mode d'action fait référence au rôle extraordinaire des HEs parmi les composés naturels, en particulier de leurs constituants hautement lipophiles. Les mécanismes cellulaires de prévention des cancers par les traitements à base d'HE ont également été considérés comme étant dus à l'induction de l'apoptose cellulaire. Il a également été suggéré

que la voie des cellules cancéreuses est sensible aux actions inhibitrices des isoprénoïdes végétaux en réduisant la taille des cellules tumorales chez les patients [58]. Certaines HEs ont montré une activité anticancéreuse potentielle contre le cancer du foie, du poumon, du côlon et de la prostate, comme l'*Artemisia lavandulaefolia* et son principal constituant, le 1,8-cinéol, contre un carcinome épidermique de la bouche [59]. L'HE de *citrus limettioides* Tan inhibe le cancer du côlon en induisant l'apoptose cellulaire [60]. L'HE du *thymus vulgaris* a montré la plus forte cytotoxicité envers le cancer de la prostate, du poumon et du sein. D'autres études ont démontré que certains constituants uniques comme le carvacrol, le thymol, le limonène et le citral ont eu un effet cytotoxique prometteur sur différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, principalement en raison de l'induction du dysfonctionnement mitochondrial. [61,62].

- **Activité anti-inflammatoire** : Les troubles inflammatoires sont associés à des douleurs, des rougeurs et des gonflements, entraînant la perte de fonctions vitales. Le mécanisme possible de la propriété anti-inflammatoire des huiles essentielles a été suggéré pour concurrencer l'acide arachidonique pour son incorporation dans la membrane. Ainsi, l'acide arachidonique génère des prostaglandines et des eicosanoïdes légèrement modifiés, qui induisent une inflammation moins importante par une induction réduite de la COX-2 [55]. D'autres études ont montré que le principal composant de l'huile de théier (l'arbre à thé), le terpinen-4-ol, supprime la production de médiateurs inflammatoires en activant les monocytes *in vitro* et réduire l'inflammation [63].

Généralement, les HEs ont des propriétés plus efficaces et plus analgésiques que de nombreux analgésiques pharmaceutiques. L'utilisation des HEs présente de nombreux avantages dans le traitement de l'inflammation, car elle a moins d'effets secondaires que de nombreux médicaments synthétiques et traditionnels [64].

- **Activité antimicrobienne** : Diverses huiles essentielles ont prouvé leur activités antimicrobiennes contre un large spectre de souches bactériennes et fongiques pathogènes. Elles peuvent donc être utilisées pour la conservation des aliments, des médicaments et des cosmétiques. Des études ont montré l'utilisation des huiles essentielles dans l'industrie alimentaire comme agents d'assainissement naturels. Cependant, l'huile essentielle de *Laserpitium garganicum subsp* a montré une très bonne activité contre certains phytopathogènes et champignons humains opportunistes (tuberculose par exemple). En outre, deux chémotypes bien définis d'huile essentielle de *thymus schimperi* présentaient une activité antifongique contre tous les isolats fongiques testés (*Penicillium chrysogenum*, *Verticillium sp.*, *Aspergillus tubingensis*, *A. minutus*, *Beauveria bassiana* et *Microsporium gypseum*) [54].

b. En industrie

Il est largement reconnu que les huiles essentielles ont de puissantes activités thérapeutiques. Cependant, étant donné leur grande volatilité, leur hydrophobie et leur nature sujette à l'oxydation, leurs applications sont souvent limitées. Avec l'avènement de techniques émergentes telles que les micros et nanotechnologies, des applications étendues des huiles essentielles se sont matérialisées dans différents domaines.

Les caractéristiques antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles ont permis leur exploration dans des emballages actifs, qui permettent de prolonger la durée de conservation tout en maintenant la qualité des aliments [65]. D'autre part, leur encapsulation dans des systèmes de nanotransporteurs permet de cibler et de moduler leur libération, renforçant ainsi leur potentiel pharmacologique pour les applications biomédicales [40]. En plus de leur pouvoir parfumant, elles servent d'antimicrobiens dans les matériaux de l'industrie textile, tandis que leurs effets biocides les rendent efficaces en tant que pesticides écologiques pour les utilisations agricoles [66].

c. En Aromathérapie

Le recours aux thérapies alternatives et complémentaires avec la médecine traditionnelle a pris de l'ampleur. L'aromathérapie tire son nom du mot « arôme », qui signifie parfum ou odeur, et de la thérapie, qui signifie traitement. C'est l'une des thérapies complémentaires qui utilisent les huiles essentielles comme principaux agents thérapeutiques pour traiter plusieurs maladies. Elle a vu le jour après que les scientifiques aient découvert les propriétés antiseptiques et de perméabilité cutanée des huiles essentielles [67]. L'inhalation, l'application locale et les bains sont les principales méthodes utilisées en aromathérapie qui utilisent ces huiles pour pénétrer la surface de la peau humaine avec une aura marquée. Une fois que les huiles sont dans le système, elles se remodelent et agissent de manière conviviale sur le site du dysfonctionnement ou sur la zone affectée. Ce type de thérapie utilise diverses variations et combinaisons pour soulager de nombreuses affections comme la dépression, l'indigestion, les maux de tête, l'insomnie, les douleurs musculaires, les problèmes respiratoires, les affections cutanées, les articulations enflées, les complications liées à l'urine, etc. [68,69]. De nombreuses plantes sont utilisées en aromathérapie en raison de la présence d'huiles essentielles ou volatiles dans différentes matières végétales comme les fleurs, les écorces, les tiges, les feuilles, les racines, les fruits, etc. Parmi les plantes utilisées en aromathérapie, citron, citron vert, orange douce, Tangerine, mandarine (écorce de fruit), cannelle (écorce), citronnelle, petit-grain, palmarosa, patchouli (feuilles), géranium, lavande, romarin (plante entière), gingembre, vétiver (racines), jasmin, rose, ylang-ylang (fleurs) [70].

7. Effets synergiques et antagoniste des huiles essentielles

L'Effet synergique est l'effet de l'interaction entre des substances chimiques ou des structures biologiques qui se traduit par un effet global supérieur à la somme des effets individuels de l'une d'entre elles. L'effet produit par les actions opposées de deux (ou plusieurs) groupes chimiques est connu comme un effet antagoniste.

Les huiles essentielles extraites sont supposées avoir une activité liée à leur composition respective, à leurs groupes fonctionnels, à la possibilité d'interactions synergiques entre leurs composants, aux proportions dans lesquelles ces huiles sont présentes et à la configuration chimique des composants qui les composent [71]

Le véritable potentiel des huiles essentielles n'a pas encore été exploré. Le potentiel antioxydant peut être accru par les interactions synergiques entre les différents composés antioxydants présents dans les huiles essentielles des plantes. Les interactions synergiques diminuent le besoin de doses de différents médicaments en combinaison, réduisant ainsi les effets secondaires causés par les concentrations élevées d'un seul médicament [72].

Des études sur les effets antioxydants et antimicrobiens des huiles en combinaison ou leur composé majoritaire ont montré des résultats prometteurs. Une combinaison d'HE coriandre/HE graines de cumin a présenté une activité antibactérienne et antioxydante synergique et peut être utilisée comme source potentielle d'agents antibactériens et antioxydants naturels sûrs et puissants dans les industries pharmaceutiques et alimentaires. Leurs interactions synergiques peuvent augmenter leur efficacité antibactérienne et antioxydante à une concentration suffisamment faible, ce qui peut réduire leurs effets secondaires indésirables et faciliter leur utilisation dans les systèmes de conservation des aliments [73]. L'analyse chimique a révélé que le linalool de l'huile de graines de coriandre et l'acide p-coumarique de l'huile de graines de cumin étaient les composés bioactifs responsables des activités antibactériennes et antioxydantes synergiques [73].

Avec l'augmentation des bactéries résistantes aux antibiotiques et le manque de nouveaux antibiotiques mis sur le marché, il faut trouver des stratégies alternatives pour faire face aux infections résultant de bactéries résistantes aux médicaments. Une solution possible pourrait consister à combiner les antibiotiques existants avec des produits phytochimiques afin d'améliorer l'efficacité des antibiotiques. Selon des études *in vitro*, les huiles essentielles (HEs) et leurs composants constituent un groupe de substances phytochimiques qui auraient de tels effets. Entre autres, les HEs contenant du carvacrol, du cinnamaldéhyde, de l'acide cinnamique, de l'eugénol et du thymol peuvent avoir un effet synergique en combinaison avec des antibiotiques [74]. Plusieurs modes d'action ont été mis en avant par lesquels les antibiotiques

Chapitre I : Synthèse bibliographique

et les composants des huiles essentielles peuvent agir en synergie, par exemple en affectant de multiples cibles, par des interactions physico-chimiques et en inhibant les mécanismes de résistance aux antibactériens. De nombreux essais signalés montrent une additivité ou une synergie modérée, ce qui indique que les HEs peuvent offrir des possibilités de réduire l'utilisation des antibiotiques [75].

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Extraction, purification et identification

1. *Carthamus caeruleus*

La plante a été récoltée en mois de Mai 2016 près de Beni snous dans la wilaya de Tlemcen. La partie utilisée été les racines. Après séchage à l'air libre (20-30 °C) dans un endroit sec et sombre. L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation à l'aide d'un un appareil de type Clevenger.

L'hydrodistillation a été réalisée à plusieurs reprises afin d'obtenir un maximum d'huile essentielle. L'huile essentielle a été analysée par CPG et CPG/SM afin d'identifier sa composition chimique.

L'hydrolat a été collecté les premières heures de l'hydrodistillation, 30 minutes après le reflux. 250 mL d'hydrolat a été extrait 3 fois avec 50 mL de l'éther diéthylique. Le solvant a été ensuite éliminé par évaporation sous vide à température ambiante.

L'oxyde de carlina a été séparé en utilisant une chromatographie sur colonne de gel de silice (FC, gel de silice 200-500 lm) élue en utilisant de l'hexane et hexane acétate d'éthyle comme éluant en augmentant la polarité avec des gradients de 100 % allant à 90-10 %.

2. *Anacyclus Valentinus*

La plante a été récoltée entre la fin Avril et début mai 2017 sur 11 stations près de Tlemcen. La partie aérienne de la plante a été utilisée sèche. L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation via un montage de type Clevenger pendant 3 heures. La composition chimique a été déterminée par l'analyse CPG/SM. L'identification des composés chimique a été établie de la manière que précédemment.

La séparation de l'huile essentielle en deux fractions (polaire et apolaire) a été procéder par chromatographie sur colonne. La fraction appolaire a été obtenue par l'utilisation du pentane 100 % quant à la fraction polaire a été obtenue par l'éther diéthylique. On s'est intéressé à l'étude de la fraction oxygénée.

3. *Chrysanthemum coronarium*

La partie aérienne de *C. coronarium* a fait l'objet de notre travail, de ce fait, la récolte a été effectuée entre la fin Avril et début Mai 2018 à Saf-Saf (Tlemcen). L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation de la matière sèche pendant 3 heures. L'identification de la composition chimique et le fractionnement a été réalisée de la même façon que pour *A. valentinus*

Les parties aériennes de *A. verticillata* ont été collectées dans l'ouest de l'Algérie pendant la floraison (Mai-Juillet 2019). L'origine géographique des différents échantillons et

le numéro de coupon de chaque échantillon analysé sont indiqués dans le tableau 1. L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation pendant 5 h à l'aide d'un appareil de type Clevenger selon la Pharmacopée européenne.

Tableau 1: Données relatives aux lieux de récolte de *A. verticillata*

<i>A. verticillata</i>						
Zone	Échantillons	Code des échantillons	Locations	Rendement (%)	Altitudes	Climat
Zone 1	S1	AVAT.05.19	Ain Temouchent	2.3	250	Humide
	S2	AVBR.05.19	Bensekrane	2.8	263	
	S3	AVSS.05.19	Sidi Safi	2.2	220	
	S4	AVBS.05.19	Beni saf	2.1	95	
Zone 2	S5	AVZT.05.19	Zarifet	3.2	835	Humide et frais
	S6	AVAF.05.19	Ain fettouh	2.9	1125	
	S7	AVM.05.19	Mafrouche	2.8	1100	
	S8	AVLS.05.19	Lalla Setti	3.6	1000	

4. Identification de la composition des échantillons

Les analyses de la chromatographie en phase gazeuse ont été effectuées à l'aide d'un appareil Perkin Elmer Auto System XL équipé d'un système de détection par ionisation à flamme double et de colonnes capillaires en silice Rtx-1 fondue (60 mx 0,22 mm d'épaisseur de film 0,25 µm ; méthylsiloxane). La température du four a été programmée par augmentation de 60 à 230 °C avec 2 °C/min et a ensuite été maintenue isothermiquement à 230 °C pendant 35 min. Injecteur et détecteur les températures ont été maintenues à 280 °C. L'azote a été utilisé comme gaz vecteur. Le volume d'injection était de 0,1 µL.

Les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse à l'aide d'un détecteur de masse Perkin Elmer Turbo (quadripôle) couplé à un système Perkin Elmer Autosystem XL équipé de colonnes capillaires en silice fondue Rtx-1 et de Rtx-Wax (température de la source d'ions, énergie d'ionisation de 150 °C, 70eV). L'énergie d'ionisation SM a été acquise sur une plage de masse comprise entre 35 et 350 Da (temps de balayage, 1 s). Les autres conditions du CPG/SM étaient comme décrites pour CPG, sauf que le split était de 1/80. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur.

L'identification de chaque composé de l'huile essentielle a été réalisée par comparaison avec :

*Des indices de rétention calculés respectivement sur des colonnes polaires et apolaires avec ceux des composés standard (bibliothèque de laboratoire « Arôme ») ou ceux rapportés dans la littérature.

*Spectres de masse (impact électronique) avec ceux de composés standard (bibliothèque de laboratoire) ou ceux présents dans des banques informatisées.

La quantification des constituants a été effectuée à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme par standardisation interne des zones de pics en utilisant les facteurs de réponse calculés par rapport au tridécane ($0,7 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) utilisé comme étalon interne.

II. Étude statistique

1. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Pour mieux comprendre la relation entre les composés volatils présents dans les différents échantillons, une analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée aux résultats expérimentaux.

L'analyse en composantes principales est une méthode statistique appropriée pour l'analyse des données sur la composition des huiles essentielles. Cette analyse a été fréquemment utilisée pour l'évaluation des similitudes et des différences entre les résultats [76].

2. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

L'analyse exploratoire des données, telle que l'ACP, est utilisée principalement pour déterminer les relations générales entre les données. Il faut parfois répondre à des questions plus complexes, par exemple les échantillons se divisent-ils en groupes ? L'analyse par clusters est une approche bien établie qui a été développée principalement par des biologistes pour déterminer les similitudes entre les organismes [76].

Diverses techniques d'analyse des clusters (AC) ont été développées et utilisées avec succès pour faciliter la visualisation de matrices de données multidimensionnelles en réduisant la dimensionnalité. Les variables ayant des caractéristiques similaires sont proches les unes des autres sur les dendrogrammes de l'AC, tandis que les variables ayant des caractéristiques différentes sont éloignées les unes des autres. En raison de la bonne visualisation des résultats, l'AC est généralement combinée avec d'autres méthodes multi variées (principalement avec l'ACP) [77].

III. Hémisynthèse de quelques analogues de carlina oxyde

1. Schéma et procédure pour l'hémisynthèse d'un analogue comprenant une liaison amide

Les réactions de formation de la liaison amides font parties des transformations les plus importantes de la chimie organique et de la biochimie en raison de la présence d'amides dans les produits pharmaceutiques, les produits naturels, ils sont également présents dans un grand nombre de matériaux industriels, notamment des polymères, des détergents et des lubrifiants [78].

La méthode la plus courante de préparation d'amide implique la réaction des dérivés d'acide carboxylique activés, tels que les chlorures, les anhydrides ou des esters avec des amines. ou bien la réaction directe des acides carboxyliques avec des amines assistées par des quantités stœchiométriques de réactifs de couplage tels que les carbodiimides ou les dérivés de 1H-benzotriazoles [79].

Le schéma proposé comprend une étape qui permet le passage de carlina oxyde a un composé comportant un groupe nitro par une nitration, suivit d'une réduction afin d'obtenir une amine qu'on fait réagir avec un acide carboxylique pour générer un analogue incluant une liaison amide.

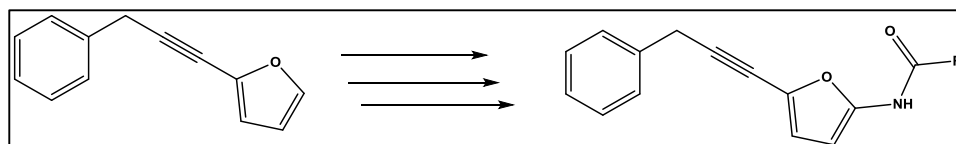


Schéma 1: Chemin réactionnel proposé de l'hémisynthèse d'un analogue de carlina oxyde

- *2-Nitro-5-(3-phényl-prop-1-ynyl) -furan (IM1)*

Les dérivés nitrés d'hétérocycles à cinq chaînons présentent un intérêt considérable : certains sont biologiquement actifs avec des propriétés anti-inflammatoires ou possède une activité vasodilatatrice les autres sont utilisés comme intermédiaires réactionnels dans la synthèse de nombreux composés biologiquement actifs [80].

La nitration d'hétérocycles à cinq chaînons tels que les furanes est généralement effectuée avec un mélange d'acide nitrique concentré (ou fumant) et d'acide sulfurique concentré, ou dans certains cas avec de l'acide nitrique concentré et de l'anhydride acétique suivi de pyridine [80,81].

Mode opératoire 1 :

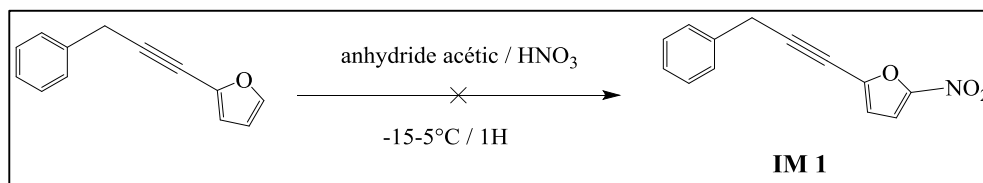


Schéma 2: Nitration de carlina oxyde méthode 1

200 mg de carlina oxyde ont été dissoutes dans 0.8 mL à température ambiante. La solution préparée est ajoutée goutte à goutte à une solution de l'acide nitrique 0.3 mL dans 0.4 mL d'anhydride acétique entre -15°C et -5°C . L'agitation est poursuivie à -15°C pendant 1H. Le mélange est par la suite versé dans de la glace et agité pendant 2H et laissé à température ambiante pendant 24 H. Au-delà de 24 H un précipité se forme. Ce dernier est dissout dans l'éther diéthylique, laver avec l'eau, séché et le solvant est éliminé par évaporation. Le produit obtenu a été purifié par hexane-éther diéthylique (90-10%).

Mode opératoire 2 :

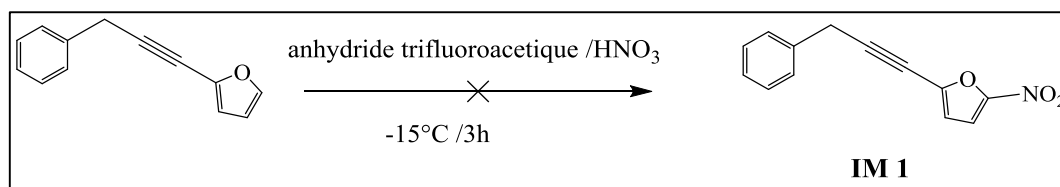


Schéma 3: Nitration de carlina oxyde méthode 2

Un mélange de l'anhydride trifluoroacétique et acide nitrique a été refroidi à -15°C . Après 1 heure une solution de carlina oxyde dans l'anhydride trifluoroacétique est ajoutée graduellement au mélange réactionnel en maintenant la température à -15°C . Le système est gardé sous agitation pendant 2 heures. L'anhydride trifluoroacétique est par la suite évaporé et 0.16 mL de pyridine est ajoutée. Le mélange réactionnel est mis sous agitation pendant 15 minutes. La pyridine est par la suite évaporée et le produit obtenu sous forme pâteux est mis dans la glace est extrait avec l'éther diéthylique.

On s'est arrêté à la première étape pour la synthèse d'un analogue avec une liaison amide car la nitration n'a pas eu lieu.

Schéma et procédure pour l'hémisynthèse d'un analogue de carlina oxyde par condensation avec une amine

Les amines sont souvent présentes dans des produits naturels, ayant des structures assez complexes associées à diverses autres fonctions.

Les amines jouent un rôle important dans la survie de l'organisme vivant. Elles participent à la création des acides aminés, éléments constitutifs des protéines chez les êtres vivants. De nombreuses vitamines sont également construites à partir d'acides aminés. Les

amines biogènes sont des composés azotés d'importance. Ils peuvent être présents dans les aliments crus et transformés.

Ce schéma est basé sur la réaction de substitution d'un alcool par une amine. La première étape consiste en une formylation de Vilsmeier-Haack afin d'obtenir un aldéhyde qui va par la suite être réduit en alcool. Ce dernier étant un mauvais groupe partant est transformé en un bon groupe partant par tosylation qui sera substitué par la suite par une amine.

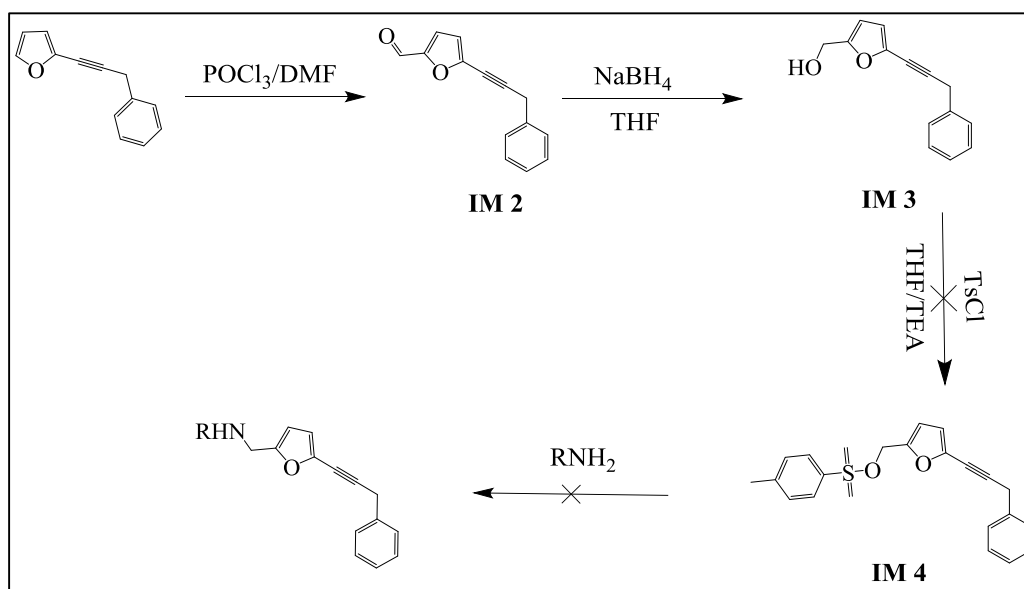


Schéma 4: Chemin réactionnel pour l'hémisynthèse d'un analogue de carlina oxyde

2.1. 5-(3-phenylprop-1-yn-1-yl) furan-2-carbaldehyde (IM 2) :

La formylation de composés organiques avec des formamides de substitution est l'une des méthodes les plus largement utilisées pour la préparation des aldéhydes aromatiques et hétérocycliques. Un groupe aldéhyde peut être introduit dans divers cycles aromatiques et hétérocycliques par l'une ou l'autre des réactions suivantes : Gattermann, Gattermann-Koch, Reimer-Tiemann, Duff [82].

En 1927, Vilsmeier et Haack ont observé que le N-méthylformanilide peut formyler des dérivés de l'aniline en présence de POCl_3 [83]. Plus tard, la réaction a été étendue en utilisant des dérivés simples du formamide comme le N,N-diméthylformamide, la N-formylpipéridine, la N-formylmorpholine, etc. Pour formyler des substrats aromatiques et aliphatiques riches en électrons, et ces types de réactions sont connus sous le nom de réactions de Vilsmeier-Haack. le réactif de Vilsmeier-Haack est produit lorsqu'un formamide ou un amide disubstitué, généralement le N,N-diméthylformamide (DMF), est traité avec un halogénure d'acide, souvent de l'oxychlorure de phosphore, mais dans une moindre mesure, du chlorure d'oxalyle [84].

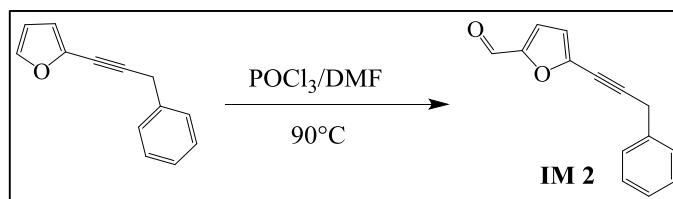


Schéma 5: Formylation de vilsmeier-Haack

- Mode opératoire 1 :** Une quantité de 0,85 mL de POCl_3 a été ajoutée goutte à goutte à 0,80 mL de DMF anhydre à 0°C ; le mélange a été laissé pendant 20 minutes. Sous refroidissement externe 8,23 mmol d'oxyde de carlina, isolé de l'huile essentielle des racines de *carthamus caeruleus* ont été ajoutés lentement, en évitant une surchauffe de mélange à une température au-dessus de 50°C . Après avoir ajouté le produit entier, le mélange a été laissé sous agitation pendant 45 minutes à 90°C et versé chaud sur la glace. Le mélange obtenu a été neutralisé avec 60% de K_2CO_3 . La phase organique est extraite 3 fois avec du chloroforme séché sous MgSO_4 . Après élimination sous vide du solvant, le résidu obtenu sous forme d'une pâte noire a été purifié par colonne chromatographique sur gel de silice avec un mélange [80 :20] de cyclohexane-éther diéthylique.

- Mode opératoire 2 :** le même mode opératoire a été reproduit en ajoutant un piège à gaz HCl et quelques gouttes de la triéthyle amine

2.2. (5-(3-phenylprop-1-yn-1-yl)furan-2-yl)methanol (IM3)

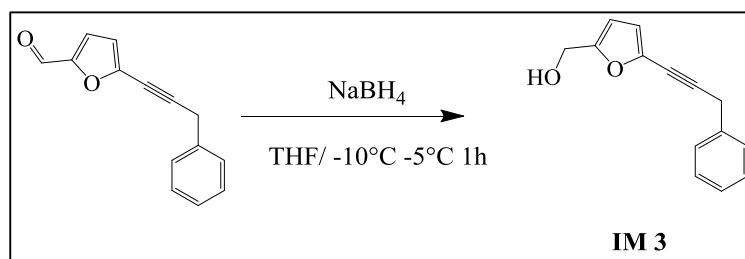


Schéma 6: Réduction d'IM 2

0.4 mmol de IM8 est dissoute dans le THF sec à laquelle 3éq de NaBH_4 sont ajoutées. Le système est mis sous agitation de -10 à 5°C pendant 1H. La réaction est arrêtée par l'ajout de l'eau froide. Le mélange réactionnel est extrait avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec de la saumure, séchée avec MgSO_4 , filtré et le solvant est éliminé par évaporation.

2.3. (5-(3-phenylprop-1-yn-1-yl)furan-2-yl)methanol toluene sulfonate (IM4)

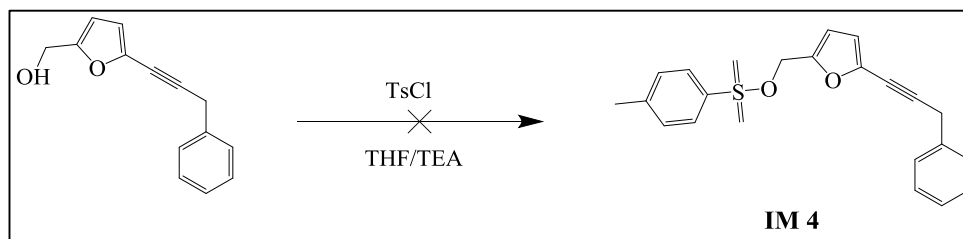


Schéma 7: Protection du groupement hydroxyle par tosylation

100 mg de IM3 est dissout dans du dichlorométhane à lequel 4 éq de triéthylamine est ajoutée à 0°C. 4 éq de chlorure de tosyl est par la suite ajouté au mélange en petite quantité. La réaction est suivie par CCM les premières heures et laisser pendant plusieurs heures à température ambiante sous agitation. La réaction n'a pas eu lieu.

Le chemin réactionnel proposé en schéma 6 a été arrêté à la deuxième étape. Une autre alternative a été proposée pour faire une condensation avec une amine.

2.4. *Amination réductrice (IM8-IM12)*

L'amination réductrice est la conversion d'un aldéhyde ou d'une cétone en une amine via une imine intermédiaire. Cette réaction est considérée comme le moyen le plus remarquable pour synthétiser des amines complexes, et une majorité des amines préparées dans l'industrie pharmaceutique sont fabriquées par ce procédé [85].

Le choix de l'agent réducteur est très crucial pour le succès de la réaction, car l'agent réducteur doit réduire les imines (ou les ions iminium) de manière sélective par rapport aux aldéhydes ou aux cétones dans les conditions de la réaction. La réaction d'amination réductrice est décrite comme une réaction directe lorsque le composé carbonyle et l'amine sont mélangés avec l'agent réducteur approprié sans formation préalable de l'imine ou du sel d'iminium intermédiaire. Une réaction par étapes ou indirecte implique la préformation de l'imine intermédiaire suivie d'une réduction dans une étape séparée [86].

a. *methyl ((5-(3-phenylprop-1-yn-1-yl)furan-2-yl)methyl)tryptophanate (IM5)*

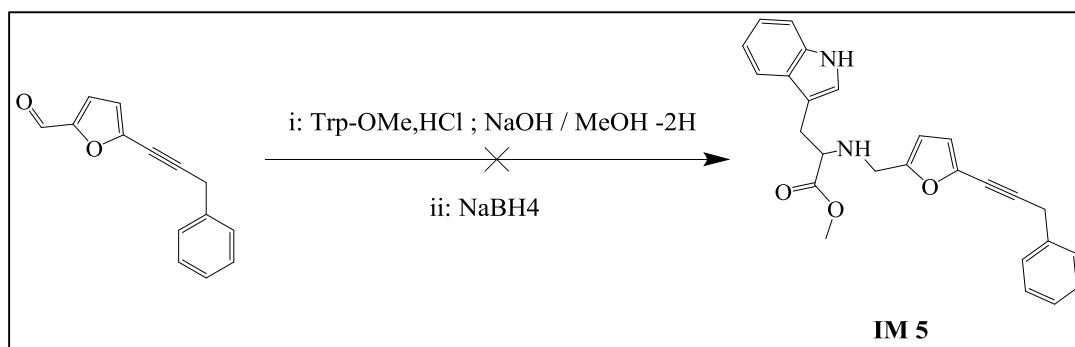


Schéma 8: Hémisynthèse de l'analogue IM5

50 mg de tryptophane de méthyle dissoute dans 2 mL du methanol. 50 mg de IM2 a été ajoutée, le tout a été porté sous reflux. Après plusieurs heures (réaction suivie par CCM) NaBH₄ a été ajouté au milieu après refroidissement totale du mélange a une température de 0°C, la reaction est laissé pendant 1H sous agitation. La reaction n'a pas eu lieu.

b. *3,4,5-trimethoxy-N-((5-(3-phenylprop-1-yn-1-yl)furan-2-yl)methyl)aniline (IM 6) et 3,5-dinitro-N-((5-(3-phenylprop-1-yn-1-yl)furan-2-yl)methyl)aniline (IM 7)*

Le triacétoxyborohydrure de sodium est un agent réducteur courant pour l'amination réductrice des aldéhydes et des cétones. Ce réactif borohydrure est doux et présente une sélectivité remarquable comme agent réducteur. Il réduit les aldéhydes de manière sélective par rapport aux cétones. Les effets stériques et attracteurs d'électrons des trois groupes acétoxy stabilisent la liaison bore-hydrogène et sont responsables de ses propriétés réductrices faibles [87].

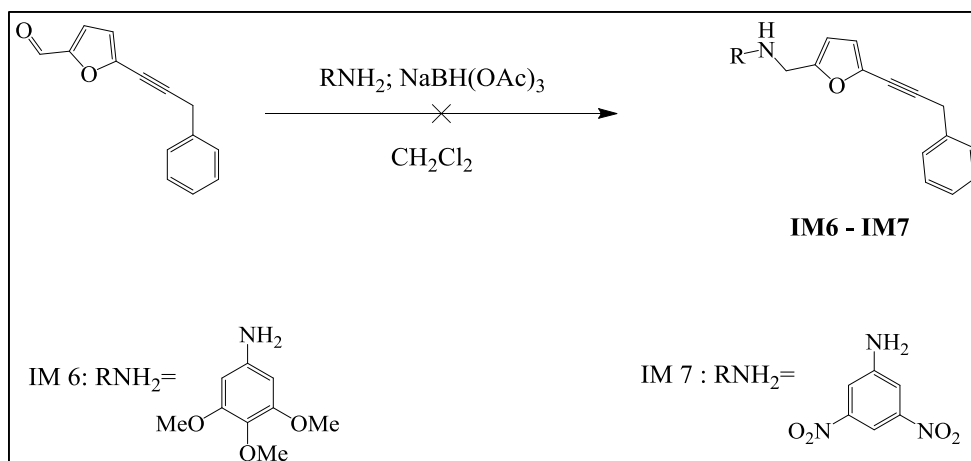


Schéma 9: Hémisynthèse des analogues IM 6 et IM 7

100 mg de IM2 et 2 eq de triméthoxy aniline ou 3,5-dinitroaniline (pour la préparation de IM6 et IM7 respectivement) sont dissouts dans 5 mL de dichloromethane, puis traités avec du triacétoxyborohydrure de sodium (2éq) et de l'AcOH (1éq). Le mélange a été soumis à une

agitation à température ambiante sous atmosphère d'azote pendant 24 heures. L'évolution de la réaction a été suivie par CCM. La réaction n'a pas eu lieu.

c. Procédure générale de la préparation de IM8- IM11 :

L'utilisation fructueuse du cyanoborohydrure de sodium est due à sa stabilité dans des solutions acides relativement fortes (pH~3), à sa solubilité dans des solvants hydroxyliques tels que le méthanol, et à ses différentes sélectivités à différentes valeurs de pH. La réduction des aldéhydes et des cétones se déroulant facilement à pH 3-4. La réaction d'un aldéhyde ou d'une cétone avec l'ammoniac, une amine primaire ou secondaire à pH -7 en présence de NaBH₃CN conduit à la formation d'amines primaires, secondaires ou tertiaires, respectivement, par amination réductrice du groupe carbonyle [88].

Les chlorhydrates d'ester d'acide aminé utilisés pour la préparation des analogues **IM8-IM11** sont glycine éthyle ester, L-phenylalanine méthyl ester, L-valine méthyl ester et L-leucine méthyl ester

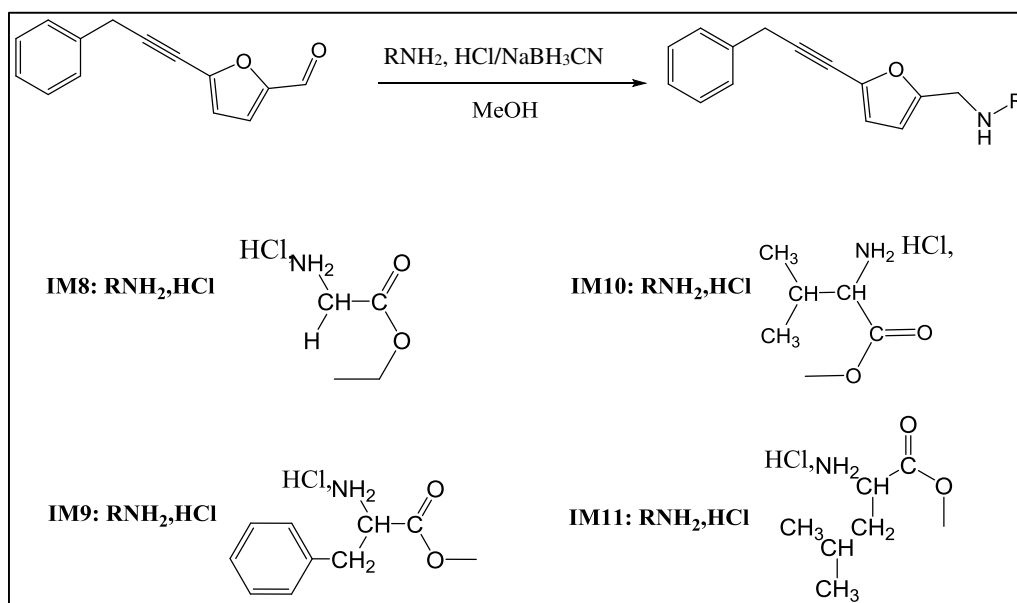


Schéma 10: Hémisynthèse de l'analogue IM 8 -IM 11

IM2 (0,5 mmol) et le chlorhydrate d'ester d'acide aminé correspondant (5eq, 1eq, 5eq, 5eq) respectivement ont été dissous dans du MeOH (15 mL), puis du NaBH₃CN (2eq) a été ajouté. Le mélange a ensuite été agité à température ambiante jusqu'à ce que la matière première disparaisse. La réaction a été suivie par chromatographie en couche mince (CCM) et RMN ¹H. À la fin de la réaction, le solvant a été éliminé, le résidu a été lavé à l'eau distillée et extrait 3 fois avec de l'éther diéthylique. Les phases organiques combinées ont ensuite été séchées sur MgSO₄ et filtrées. Après élimination du solvant par évaporation, le résidu a été purifié par chromatographie sur colonne avec éther diéthylique-cyclohexane pour donner les produits correspondants.

d. Procédure générale de la préparation de IM12

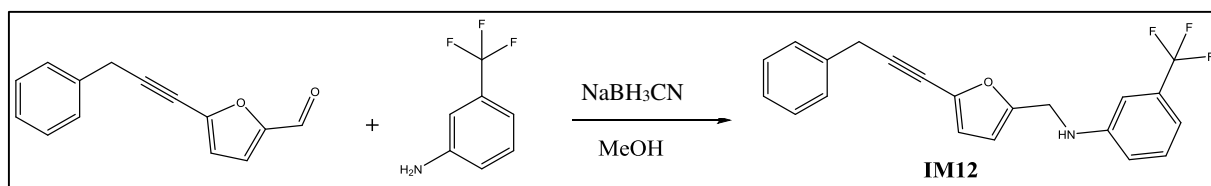


Schéma 11: hémisynthèse de l'analogue IM 12

IM2 (1 mmol) et 3-(Trifluorométhyl) aniline (1eq) ont été dissous dans du CH₃OH auquel on a ajouté quelques gouttes d'acide acétique. Le NaBH₃CN (1eq) a ensuite été ajouté sous agitation. La réaction a eu lieu à température ambiante et a été suivie par CCM et RMN ¹H. À la fin de la réaction, le solvant a été éliminé par évaporation sous vide et le résidu a subi le même traitement que les composés précédents. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne par un mélange de cyclohexane-éther diéthylique comme éluant.

2.5. Condensation de Knoevenagel

La réaction de Knoevenagel désigne les réactions de formation de liaisons carbone-carbone à partir de cétone ou d'aldéhyde avec un composé méthylène activé (X-CH₂-Y, où X et Y sont des groupes attracteurs d'électrons) pour produire un composé α, β insaturé [89].

En général, les réactions de Knoevenagel sont réalisées en utilisant de grandes quantités de pyridine comme solvant et de pipéridine comme organocatalyseur. La pyridine est toxique et représente un risque important pour la santé, son utilisation comme solvant n'est pas souhaitable et devrait être considérablement réduite ou éliminée [90]. De ce fait plusieurs méthodes plus écologiques de la condensation Knoevenagel ont été développées en utilisant des amines inoffensives ou des sels d'ammonium comme catalyseurs [91]. Une amélioration majeure est obtenue lors des condensations de Knoevenagel est réalisées à l'état solide ou sans solvant, catalyseur et support dans la masse en fusion stoechiométrique. Les réactions rapportées se déroulent quantitativement et sans déchets [92].

a. Préparation du composé méthylène activé :

Le cyano acétate de méthyle est un composé méthylène actif, c'est un produit commercialisé. À cause de son absence au laboratoire on l'a synthétisé par estérification de l'acide cyano-acétique

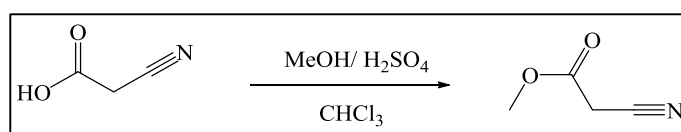


Schéma 12: Estérification de l'acide cyano-acétique

5g de l'acide cyano-acétique est dissoute dans 10 mL de chloroforme à laquelle 3,4 mL de MeOH est ajouté avec une quantité catalytique (quelques gouttes) de l'acide sulfurique. Le système est porté à reflux pendant 6 heures. À la fin de la réaction, le solvant et l'excès du méthanol est éliminé par évaporation sous vide. Le résidu est dissout dans du dichlorométhane et neutralisé avec une solution de bicarbonate de sodium 5%. La phase organique est séchée avec du MgSO₄ et le solvant est évaporé.

b. Procédure générale de la préparation de IM13

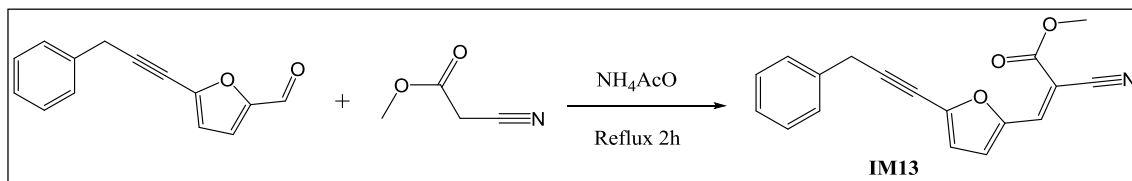


Schéma 13: Hémisynthèse de l'analogue IM13

Dans un ballon bicol muni d'un réfrigérant, on fait réagir 50 mg de IM2 avec 23 mg de cyano-acétate de méthyle en présence de 2,5 éq de l'acétate d'ammonium sous reflux de 2h à 80°C. À la fin de la réaction, le mélange est traité avec l'acide chlorhydrique a 5% est extrait avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NH₄Cl, séchée sur MgSO₄ et le solvant est éliminer par évaporation sous vide. Le produit obtenu est purifié par colonne chromatographique en utilisant l'hexane-éther diéthylique (90-10 %) comme éluant.

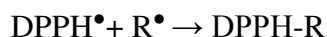
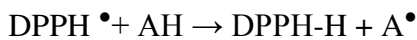
IV. Étude de l'activité antioxydante

I. Activité de piégeage des radicaux libres (DPPH)

1.1. Principe de la méthode

Il existe de nombreuses preuves que les radicaux libres causent des dommages oxydatifs aux biomolécules, ce qui conduit à l'athérosclérose, au vieillissement, au cancer et à de nombreuses autres maladies. Les antioxydants, qui éliminent les radicaux libres, sont connus pour leur rôle important dans la prévention de ces maladies induites par les radicaux libres. Les remèdes à base de plantes contiennent une grande variété d'antioxydants qui éliminent les radicaux libres. Les antioxydants naturels et leur rôle dans la santé et la nutrition suscitent actuellement un vif intérêt [93].

Le DPPH est un radical stable de couleur violet profond dont la réaction avec d'autres radicaux, des agents réducteurs ou des composés capables de transférer des atomes d'hydrogène entraîne une perte de couleur à 515 nm.



Le dosage du DPPH est simple et le moins coûteux, ce qui explique sa popularité et son utilisation étendue. Seul le réactif, quelques cuves et un spectrophotomètre UV-vis sont nécessaires. Les cristaux de DPPH sont dissous dans du MeOH ou de l'EtOH, l'absorbance initiale de DPPH est enregistrée, une aliquote de l'antioxydant testé est ajoutée. Le mélange est incubé pendant 30 minutes et l'absorbance finale est enregistrée [94,95]

Le DPPH[•] est un radical stable, de ce fait, de lentes réactions antioxydantes peuvent être détectées expérimentalement. Cependant, la pertinence de ces réactions lentes pour l'extinction des radicaux hydroxyles et lipides à courte durée de vie dans les aliments et les tissus est très discutable. Même si la raison d'être de longues périodes d'incubation est la détection de l'action des produits antioxydants, les radicaux dans les systèmes réels ne survivent pas assez longtemps pour rencontrer ces produits, et les produits eux-mêmes réagissent donc ne s'accumulent pas pour éteindre les radicaux au fur et à mesure de leur formation dans les réactions. Par conséquent, l'orientation du test DPPH doit être modifiée pour déterminer les processus précoces qui sont les plus susceptibles d'être actifs avec des radicaux instables tels que HO[•], HOO[•], et NO[•]. Cela signifie qu'il faut enregistrer les réactions de préférence sur 4 min et pas plus de 6-10 min [94].

1.2. Mode opératoire

L'activité anti-oxydante de l'huile essentielle des différents échantillons (huiles essentielles, composé majoritaire, analogues ...) a été mesurée en termes de don d'hydrogène ou de capacité de piégeage des radicaux à l'aide de la méthode DPPH des radicaux stables. La diminution de la capacité des radicaux DPPH a été déterminée par une baisse de leur absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants.

Un volume de 100 µl de différentes concentrations (1 à 50 mL/L) de chaque extrait a été ajouté à 25 µL de la solution méthanolique de DPPH (0,5 mM) fraîchement préparée. Après incubation dans l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée avec un spectrophotomètre à 517 nm. L'étalon de référence (BHT) était également analysé selon la même procédure. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH a été calculé selon la formule suivante :

$$I\% = \frac{[Ac - Ae]}{Ac} \times 100$$

Où Ac est l'absorbance de la réaction de contrôle (sans extraits), et Ae est l'absorbance en présence d'extraits. Les IC₅₀ (concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de

la forme réduite du radical DPPH), sont calculées graphiquement par la régression linéaire des graphiques tracés ; Les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Les Tests ont été réalisés en triplicata.

2. Test de la réduction du fer (Ferric reducing antioxidant power : FRAP)

2.1. Principe de la méthode

Le mécanisme du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) est basé sur le transfert d'électrons plutôt que sur le transfert d'atomes d'hydrogène. Les antioxydants de l'échantillon réduisent le complexe $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$ à la forme ferreuse $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$ colorée en bleu suite à l'ajout d'un excès d'ions ferriques (Fe^{3+}), avec une augmentation de l'absorbance à 700 nm[96].

2.2. Mode opératoire

La méthode utilisée pour les échantillons est celle décrite par Oyaizu [97] avec quelques modifications. Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,5 à 50 mg/L) a été mélangé avec 2,5 mL de tampon de phosphate (0,2 M, pH=6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1 %. Le tout était centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min. À la fin, 2,5 mL du surnageant de chaque concentration a été mélangé à 2,5 mL de l'eau distillée et 0,5 mL de FeCl_3 (0,1 %). Après 30 min d'incubation, les absorbances ont été mesurées à 700 nm en utilisant un spectrophotomètre visible à double faisceau contre l'éthanol (80 %) comme vide. Le BHT a été utilisé comme témoin positif. Analyses ont été réalisés en triplicata.

3. Test de blanchiment du β -carotène

3.1. Principe de la méthode

Le principe de la méthode est basé sur la décoloration de la couleur jaunâtre d'une solution de β -carotène due à la rupture de la conjugaison π par réaction d'addition du radical lipide ou peroxyde lipide à la double liaison $\text{C}=\text{C}$ de β -carotène. Le radical est généré par l'auto-oxydation de l'acide linoléique par chauffage. Lorsque l'antioxydant approprié est ajouté à la solution, la décoloration peut être retardée par la réaction de concurrence entre β -carotène et l'antioxydant avec les radicaux présents [98].

3.2. Mode opératoire

L'étude de la capacité des huiles essentielles et des mélanges à prévenir le blanchiment du β -carotène est effectuée selon la méthode décrite par Bougateg et al [99]. Une solution de 0,5 mg de β -carotène dans 1 mL de chloroforme a été mélangée à 25 μl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été évaporé sous pression réduite à 45 °C dans un

évaporateur rotatif, puis 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés et le mélange obtenu a été agité vigoureusement. Le milieu réactionnel contient 2,5 mL de l'émulsion β -carotène/acide linoléique et 0,5 mL des solutions d'extraits ou de la référence antioxydante (BHT). Le mélange a été placé dans un bain d'eau et incubé à 50 °C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion précédente a été suivie par la mesure de l'absorbance de chaque échantillon juste après sa préparation (t = 0 min) et à des intervalles de 15 min jusqu'à la fin de l'expérience (t = 120 min) à 470 nm. Le contrôle négatif contient 0,5 mL d'eau distillée au lieu des huiles essentielles et de l'antioxydant standard. L'activité antioxydant a été exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle négatif selon l'équation suivante :

$$\% = [1 - (A_{t0} - A_{t120})_{\text{test}} / (A_{t0} - A_{t120})_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Où A_{t0} : absorbance initial (t = 0 min), A_{t120} : absorbance au temps t= 120 min.

Les IC_{50} ont été calculées graphiquement par la régression linéaire des graphiques tracés; les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Les tests ont été effectués en triplicata.

V. Étude de l'activité antifongique

Les souches fongiques *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus flavus* et *Rhizopus oryzae*, responsables de la pourriture de l'olive, ont été isolées directement des fruits dans les champs. Toutes les espèces fongiques isolées ont été transférées dans des boîtes de Pétri de 9 cm stérilisées à l'acide lactique (20%) pour arrêter la croissance des souches. Les plaques ont été incubées à 25 °C pendant 14 jours dans l'obscurité. Chaque souche fongique a été identifiée sur la base de ses caractéristiques morphologiques et microscopiques en suivant la bibliographie [100,101].

1. Essai antifongique in vitro

L'activité antifongique des extraits testés contre les souches de champignons a été réalisée par la technique du contact direct en suivant le mode opératoire décrit Singh et al [102] par des concentrations allant de 10 à 100 mg/L ont été obtenues en ajoutant 0,5 mL de solutions préalablement préparées dans un tube contenant 9,5 mL de milieu PDA à une température comprise entre 45 et 50 °C. Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le contenu des tubes a été versé dans des boîtes de Pétri. On a laissé les boîtes sécher pendant 15 à 20 minutes. Une boîte de Pétri contenant 10 mL de milieu PDA sans extrait a été utilisée comme témoin négatif. Un disque mycélien de 9 mm de diamètre, découpé à la périphérie de la pré-culture de 5 jours, a été inoculé de manière aseptique au centre de chaque boîte de Pétri. Toutes les boîtes de Pétri ont été scellées avec un parafilm stérile et incubées à 28 °C pendant 9 jours. L'efficacité du

traitement a été évaluée quotidiennement en mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie. Le pourcentage d'inhibition de la croissance des deux champignons testés, par rapport au témoin, a été calculé jusqu'au 9^e jour, en utilisant la formule suivante [103].

$$I\% = \frac{DC - DT}{DC} \times 100$$

Où DC est le diamètre de la croissance mycélienne du témoin négatif, DT est le diamètre moyen du champignon de la colonie de traitement.

2. Essai antifongique *in vivo* de l'huile essentielle de *C. caeruleus* et carlina oxyde

L'activité antifongique *in vivo* de l'huile essentielle et de l'oxyde de Carlina sur des pommes inoculées par injection a été réalisée selon la méthode de Tian et al [104]. Les pommes ont été sélectionnées en fonction de leur maturité, de leur uniformité et surtout de l'absence de symptômes visibles de pourriture à leur surface. À l'aide d'un coton-tige, 10⁶ spores/mL de l'inoculum fongique préparé au préalable ont été grattées à la surface des colonies et remises en suspension dans de l'eau distillée contenant 0,5% de Tween 80. Des papiers filtres de 4 cm de diamètre ont été imprégnés de 0,01 mg d'huile essentielle et d'oxyde de carlina et placés dans des récipients en polystyrène (1L) (sans aucun solvant) pour atteindre une concentration finale de 0,01 mg/L d'air. Des expériences de contrôle ont été réalisées sans aucun traitement.

Les concentrations capables d'inhiber 50 % de la croissance du mycélium (IC₅₀) ont été calculées graphiquement par la régression linéaire des graphiques tracés.

3. Effet protecteur des huiles essentielle de *A. valentinus* et *C. coronarium* sur les pommes et les poires

Trois fruits (pommes, poires) similaires en termes de taille, de maturité, d'apparence et sans défaut physique ont été sélectionnées. Les fruits étaient stérilisés en surface à l'aide d'une solution d'éthanol à 70 % pendant 2 minutes et rincé à l'eau distillée (10 min chacun) et séché à l'air libre. Un cure-dent stérile a été inséré à une profondeur d'environ 0,3 cm, et les zones blessées ont été inoculées avec une gouttelette de la suspension conidienne de *P. expansum*. Dans une boîte en polystyrène (1 L) un papier absorbant imprégné d'un volume de 0,02 mL d'huile essentielle a été introduit.

4. Effet préventif des huiles essentielle d'*A.valentinus* et *C. coronarium* sur les pommes et les poires

En ce qui concerne l'activité préventive, le même traitement décrit précédemment avec (0,02 mL/L d'air) d'huile essentielle mais sans inoculation. Les témoins non traités ont été

préparés dans les mêmes conditions avec papier absorbant imprégné d'eau distillée. Toutes les expériences ont été répétées trois fois.

5. Effet toxique de la fumigation des huiles essentielles et de l'oxyde de Carlina sur *Bactrocera oleae*

La fumigation des extraits a été effectuée dans des boîtes en plastique transparentes et hermétiques d'une capacité de 1 L, comme une chambre d'exposition pour tester la toxicité des extraits contre les adultes de *Bactrocera oleae* (ravageur d'olivier). Trois concentrations (20, 30 et 50 µL) d'huile essentielle et d'oxyde de Carlina, sans utiliser de solvant, ont été étalées sur du papier filtre de type Wathman et fixées à la surface des couvercles. L'ensemble de contrôle n'a reçu aucun extrait. Les boîtes contenant 10 insectes du même âge ont été fermement vissées. La mortalité a été réalisée en recensant les insectes morts pendant 24 heures à partir du début de l'exposition.

Le pourcentage de mortalité des insectes a été calculé en utilisant la formule de correction d'Abbott [105].

$$Mc = \frac{(Mo - Mt)}{(100 - Mt)} \times 100$$

Où : Mc= taux de mortalité corrigé ; Mo= taux de mortalité dans les boîtes traitées ; Mt = taux de mortalité dans les boîtes témoins (mortalité naturelle).

% de mortalité = (Nombre de larves mortes/ Nombre de larves introduites) x 100

VI. Étude in-silico de l'activité antibactérienne de carlina oxyde et ses analogues.

L'arrivée des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes a eu un impact révolutionnaire décisif sur la médecine moderne. Aujourd'hui, de très nombreuses maladies qui étaient autrefois des fléaux majeurs de l'humanité ont été littéralement mises sous contrôle, voire complètement éradiquées. Cependant, il n'y a pas longtemps, des rapports ont commencé à apparaître sur de nombreux agents pathogènes qui avaient acquis une résistance à de nombreux antibiotiques utilisés auparavant contre les organismes envahisseurs [106].

Le docking moléculaire ou amarrage moléculaire est considéré comme l'outil le plus fructueux pour étudier la liaison d'une molécule (appelée ligand, généralement une substance médicamenteuse) à une deuxième molécule (récepteurs ou molécule cible, généralement des protéines, de l'ADN ou de l'ARN). Auparavant, en raison du nombre limité d'informations structurales sur les molécules biologiques, le principal problème de la biologie structurale était de déterminer les structures des récepteurs, tels que les protéines, l'ADN, l'ARN, etc.

Récemment, le nombre de structures protéiques déterminées a connu une croissance considérable. De ce fait, le docking moléculaire est de plus en plus populaire dans la découverte de chef de file [22,107].

1. Descriptions des enzymes

Des études effectuées sur des plantes de la famille des asteracées qui contiennent dans leur composition chimique un pourcentage important de carlina oxyde, montrent que ce composé acétylénique possède des activités biologiques prometteuses et notamment une activité antibactérienne intéressante [108].

1.1. *Streptococcus pyogènes* :

Streptocoque pyogene est l'un des pathogènes humains les plus courants. Moins de 10 % des individus normaux hébergent la bactérie, généralement dans les voies respiratoires et la peau, sans aucun signe de maladie. Ces dernières années, la variété, la gravité et les séquelles des infections à *S. pyogenes* ont augmenté ; en outre, en raison de l'apparition de cas occasionnels d'une maladie rapidement progressive, incurable et mortelle, cet agent pathogène est désormais une préoccupation majeure [109].

Cette bactérie échappe au système immunitaire humain par le clivage de l'anticorps IgG de sa surface, par le biais d'une cystéine protéase, provoquant ainsi des maladies bénignes telles que la pharyngite et la scarlatine ainsi que des septicémies, mais aussi des maladies mortelles. Les infections bénignes au début peuvent entraîner des complications graves comme le rhumatisme articulaire aigu [109,110]

Les cystéines protéases sont nommées ainsi en raison de l'importance du groupe thiol cystéine comme clé nucléophile dans le site actif de l'enzyme. Le groupe thiol agit comme un nucléophile dans le site actif initial de l'enzyme. Pour empêcher ce clivage, l'accès à un inhibiteur de la protéase pourrait être avantageux. Le développement d'un tel inhibiteur pour des applications thérapeutiques commence par des études visant à accroître les connaissances sur l'enzyme et son mécanisme d'action [111].

1.2. *Dihydrofolate réductase*

Les entérocoques occupent actuellement la quatrième place en termes de fréquence parmi les bactéries isolées sur des patients hospitalisés. Ce sont des agents pathogènes nosocomiaux et ils sont associés à une mortalité élevée. Les infections les plus fréquentes causées par les entérocoques sont les infections urinaires, les endocardites, les bactériémies, les abcès intra-abdominaux et intra-pelviens. Le traitement de ces infections représente un grand défi, en raison de la résistance inhérente des entérocoques à de nombreux antibiotiques [112,113].

L'acide folique est nécessaire pour assurer diverses fonctions cellulaires importantes, notamment la synthèse des acides nucléiques, en particulier de la thymidine. La plupart des bactéries sont incapables d'absorber le folate exogène de l'environnement et doivent le synthétiser à partir du précurseur de l'acide p-amino-benzoïque [112].

La dihydrofolate réductase (DHFR) est une cible antimicrobienne classique car elle favorise la réduction du 7,8-dihydrofolate dépendant du NADPH, ce qui donne du 5,6,7,8-tétrahydrofolate, qui intervient dans la biosynthèse des purines, du thymidylate et de plusieurs acides aminés. Cette enzyme est une cible intracellulaire pharmacologiquement importante pour les antagonistes du folate, notamment l'agent antibactérien triméthoprimine [113–115].

1.3. ADN gyrase

Escherichia coli tient son nom du pédiatre allemand Theodore Escherich qui l'a décrit pour la première fois en 1885. Ce microorganisme est universellement présent chez les individus en bonne santé. La bactérie *E. coli* reste avec nous tout au long de la vie, bien que certaines souches particulières disparaissent et réapparaissent au fil du temps. La plupart de ces souches sont non pathogènes et coexistent en harmonie avec leurs hôtes. En effet, la relation peut être symbiotique, en ce sens que les bactéries, en plus de bénéficier de l'hôte, peuvent synthétiser des cofacteurs et contribuer à la résistance de la colonisation contre les organismes pathogènes. D'une autre part, *E. coli* peut également être considérée comme un pathogène pluripotent par excellence, capable de provoquer une grande variété de maladies chez un large éventail d'espèces. Les hôtes sensibles comprennent les oiseaux, les porcs, les lapins, les moutons et les humains. Le système gastro-intestinal, les méninges et les reins font partie des organes cibles touchés par *E. coli*. Les maladies résultant des infections à cette bactérie comprennent la diarrhée, la dysenterie, la septicémie massive et le syndrome hémolytique et urémique [116].

L'ADN gyrase est une protéine bactérienne majeure qui est impliquée dans la réplication et la transcription et catalyse la superposition négative de l'ADN bactérien circulaire. Son absence dans l'organisme des mammifères et le rôle crucial qu'elle joue dans le cycle de réplication de l'ADN bactérien font de cette enzyme une cible très appropriée pour le développement de nouveaux agents antibactériens car son blocage induit la mort des bactéries [106,117].

2. Description de la méthode

Préparation et optimisation des enzymes et des inhibiteurs

L'étude de simulation d'amarrage moléculaire a été réalisée à l'aide du logiciel Molecular Operating Environment (MOE) [118]. La minimisation de l'énergie a été effectuée dans les

Chapitre II : Matériel et Méthodes

conditions suivantes : Température = 300°K, pH = 7, la géométrie a été réalisée en utilisant les valeurs de champ de MMFF94x et Hamiltonian AM1. La structure cristallographique aux rayons X de mSpeB, DHFR d'*Enterococcus faecalis*, et de l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (PDB : 2UZJ, 4M7U, 1KZN) respectivement, a été téléchargée de la banque de données des protéines. Les molécules d'eau ont été retirées et le récepteur a été préparé pour l'étude du docking. Des structures de composés synthétisés ont été construites et enregistrées dans leur conformation 3D.

L'énergie minimisée des ligands et leur toxicité sont présentées dans le tableau 2. La figure 2 montre le site actif des enzymes avec la molécule de co-cristallisation.

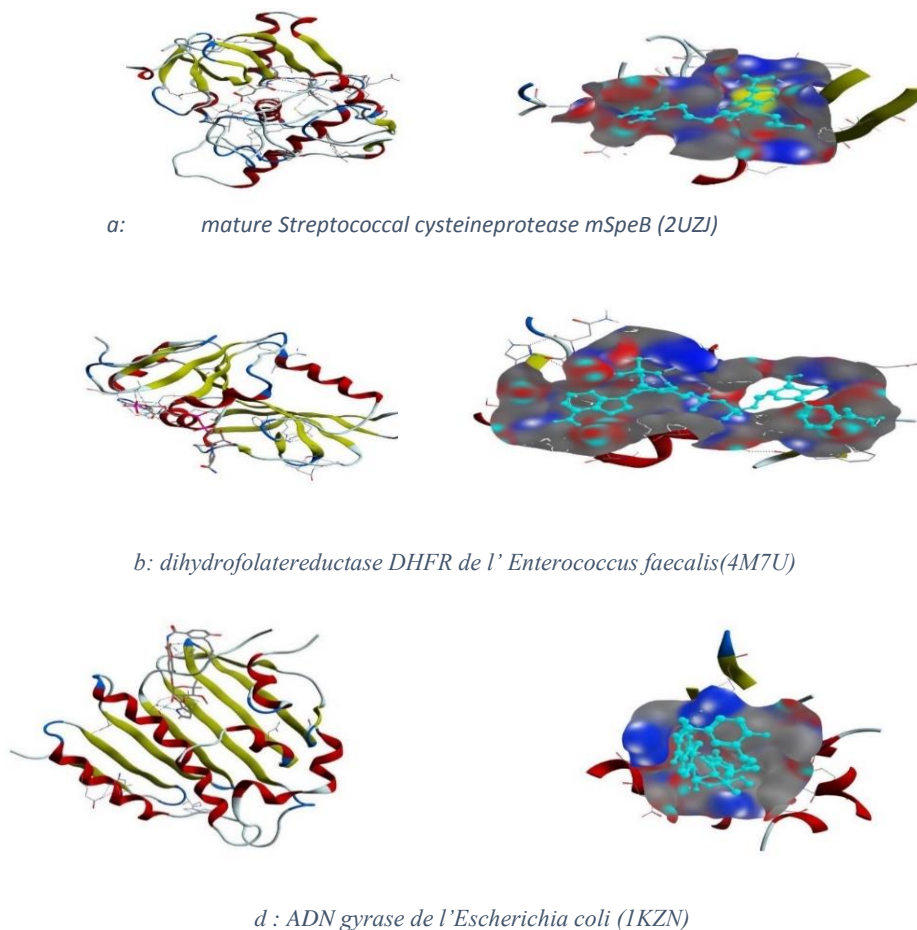


Figure 3: Modèle simplifié d'enzymes et de site actif isolé

Tableau 2: Propriétés des ligands et minimisation de l'énergie de l'oxyde de carlina et des analogues synthétisés

Ligands	Masse moléculaire g/mol	Toxicité	TPSA		Log P	Log S	Energie (Kcal/mol)
			H donn	H acc			
CarOx	182.22	no	0	0	2.87	-4.18	-2888.18710
IM2	210.23	no	0	1	2.69	-4.34	-2984.7124
IM3	212.25	no	1	1	2.63	-4.11	-3108.5952
IM8	311.38	no	1	2	3.18	-5.01	-3902.2628
IM9	373.45	no	1	2	4.01	-6.31	-5825.1593
IM10	325.41	no	1	2	3.43	-5.21	-4895.31
IM11	339.43	no	1	2	3.82	-6.04	-5175.16
IM12	355.36	no	1	0	6.08	-6.95	-4667.8431
IM13	291.31	no	0	2	2.95	-5.61	-3999.2495

Chapitre III : Résultats et discussions

I. *Carthamus caeruleus*

Dans la continuité du travail déjà réalisé par le Dr Belabbes Rania que s'inscrit cette partie de recherche.

1. Étude botanique et ethnobotanique

Carthamus caeruleus est une plante méditerranéenne de la famille des asteracées particulièrement répandu en Algérie et qui se trouve dans les champs et lieux incultes, c'est une espèce connue sous le nom chardon bleu (*caeruleus* du grec : bleu moyen), communément appelé Gergaa, Kendjar, Kinkar, Ras el hanech et du berbère : Amegresdes. Plusieurs synonymes ont été attribués à cette plante *Onobroma carruleum*, *carthamus calvus* [119,120].

Cette plante est d'une hauteur de 20-60 cm, caractérisée par une tige, simple, rarement ramifiée, avec un indumentum arachnoïdien variable, parfois glabrescent. Feuilles basales et caulinaires brillantes, simples, dentelées ou pinnatisées à lyre avec 6-10 paires de lobes ou de dents, le bord et l'apex sont épineux ; feuilles caulinaires supérieures ovées-lancéolées. Bractées involuquées avec glandes courtes, plus ou moins poilues arachnoïdes ; bractées externes en forme de feuille, dentelées épineuses, aussi longues ou plus longues que l'interne. Akènes d'environ 6 mm, plus ou moins obpyramidaux, discrètement coudés, rétrécis du milieu à la base, rugueux vers l'apex ; écailles de pappus ciliées, blanchâtres, 2 fois plus longues que l'acène, libres, persistantes. L'inflorescence se présente sous forme d'un capitule gros (3 cm de large sur 3-4 de long), solitaires au sommet de la tige et des rameaux, globuleux ou ovoïdes, dont les corolles sont bleues [16,121].



Reserve de chasse Moutass. Tlemcen (24 /05/2016.)



(The ladies' flower-garden of ornamental perennials.PI.58)

Figure 4: Illustrations *C. caeruleus*

Cette plante est utilisée par plus de 74 % de la population de l'ouest Algérien, dont 66% des femmes âgées de plus de 44 ans. Ces racines sont utilisées sous forme de poudre ou une préparation crémeuse dans du lait afin de guérir les différents degrés de brûlure.

L'étude menée sur des rats a montré que l'utilisation de cette crème pendant une quinzaine de jour a permis de réduire de 85% la surface brûlée, ce qui est intéressant vu qu'elle est largement supérieure à celle réduite par le médicament Madécassol connu comme crème cicatrisante [122].

2. Travaux antérieurs

2.1. *Carlina oxyde*

Comme de nombreux produits naturels, les composés acétyléniques d'origine naturelle peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé ou se révéler très actifs contre les agents pathogènes ou les carcinomes. L'un de ces composés, l'oxyde de carlina, est obtenu par distillation à la vapeur d'eau des racines de plusieurs plantes de la famille des astéracées tels que les chardons.

Benzyl 2-furylacetylene ou carlina oxyde est un composé acétylénique naturel. Ce composé se trouve en majeure partie dans l'huile essentielle ou extrait de plante de la famille des astéracées et notamment, *Atractylis Gummifera*, *Carlina Accaulis*, *Carlina Acanthifolia* [123-127]. SEMMLER a considéré qu'il était tout à fait improbable que le composé ait une liaison acétylénique en partant de l'hypothèse que les acétylènes sont trop instables pour être présents dans la nature [128,129].

La structure correcte, illustrée dans la figure 5, a été attribuée de nombreuses années plus tard par Gilman et al, sur la base de la synthèse totale et de la comparaison avec les données analytiques du produit naturel [130]. Carlina oxyde un composé optiquement inactif (pouvoir rotatoire $\pm 0^\circ$) est caractérisé par une température d'ébullition de 167° à 168° (à 22 mmHg) [131].

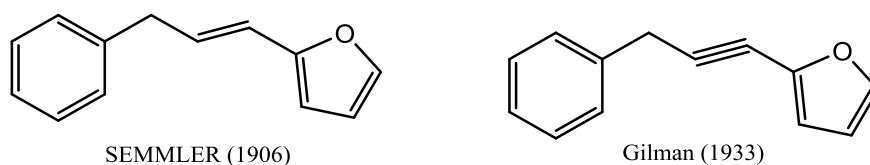


Figure 5: Carlina oxyde selon SEMMLER et Gilman

En 1935 Alexandre St. Pfau et al ont synthétisé carlina oxyde en partant du furyl-ethylene par dibromation et élimination de Bromure d'hydrogène pour obtenir le furyl-acétylène qui par la suite est transformé en un organo magnésien par le bromure d'éthyle magnésium et condensé avec un chlorure de benzyle [132].

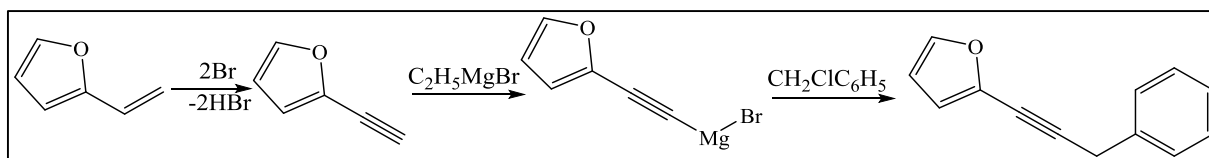


Schéma 14: Approche synthétique proposé par A.S.Pfau et al (1935)

Une autre approche synthétique a été élaboré par R. E. Atkinson en 1967 qui consiste à une réaction entre 1,2-iodofurane et le sel cuivreux de 3-phénylpropyne en présence de pyridine [133].

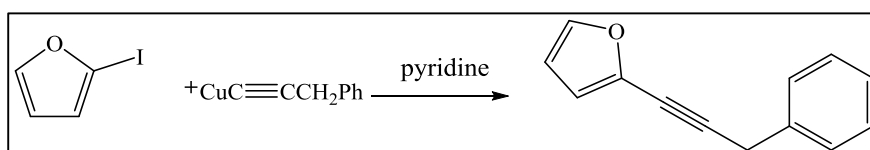


Schéma 15: Approche synthétique proposé par R.E. Atkinson (1967)

2.2. Activité biologique

Plusieurs plantes dont l'huile essentielles se compose majoritairement de l'oxyde de carlina, ont montré des activités biologiques prometteuses. L'hypothèse tiré de ces études est le composé majoritaire est probablement à l'origine de ces activités (**Tableau 3**).

Tableau 3: Activités biologiques des plantes comportant carlina oxyde majoritairement

Plantes	% carlina oxyde	Activités biologiques
<i>Carlina acanthifolia</i> ^a	91.5	Antimicrobienne, antioxydante, anti inflammatoire et gastro protectrice [134]
<i>Carlinae radix</i> ^{a,b}	98.9	Antimicrobienne, antioxydante [126]
<i>Carlina acaulis</i> ^a	94.6	antimicrobienne, insecticides, antioxydante [127,135]
<i>Atractylis gummifera</i> ^a	63.2	Insecticide, antioxydante[124]

a : huile essentielle des racine. b : un mélange de racine de *carlina acaulis* et *carlina acanthifolia*

Il a été confirmé que l'oxyde de carlina est très actif contre deux souches du *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA) et présente une activité forte et sélective contre *Trypanosoma brucei*, le parasite responsable de la trypanosomiase africaine (maladie du sommeil) [108].

Dans une étude comparative entre l'huile essentielle des racines de *Carlina acaulis* et carlina oxyde sur le pouvoir insecticide a montré que ce dernier est responsable de l'activité de l'huile essentielle de carlina oxyde. La même étude a montré que l'oxyde de carlina présente une certaine cytotoxicité non sélective vis-à-vis des cellules normales du derme humain et des lignées cellulaires tumorales. La toxicité de l'oxyde de Carlina est en partie due à l'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase [127].

3. Rendement et Composition chimique des huiles essentielles et de l'extrait d'hydrolat de *C. caeruleus*

Les échantillons de *C. caeruleus* ont été prélevés dans huit (08) régions de la wilaya de Tlemcen (Algérie) (**Tableau 4**). Les huiles d'une odeur narcotique et d'une couleur jaunâtre qui vire vers le roux après 24H ont été obtenues avec un rendement variant de 0.9 à 2.3%.

Tableau 4: Données relatives aux lieux de récolte de *C. caeruleus* d'Algérie

Zones	Echantillons	N° Voucher	Sites de récoltes	Rdts (%)	Altitudes	Climats
Zone 1	S1	CCFI.06.19	Fandi	1.9	1500	Humide et plus frais
	S2	CCKS.06.19	Beni snous	2.3	1500	
	S3	CCFR.06.19	Hafir	2.1	1100	
	S4	CCTY.06.19	Terny	1.8	1220	
Zone 2	S5	CCBR.06.19	Bensekrane	0.6	263	Sèche
	S6	CCAR.06.19	Amieur	0.9	319	
	S7	CCCH.06.19	Chetouane	1.2	600	
	S8	CCOB.06.19	Ouchebea	1,1	775	

Il est à noter que les rendements d'extraction ont été calculés par rapport à la masse de matière sèche. D'après le tableau 4, on observe que les échantillons des stations situées en haute altitude et avec climat humide et plus frais (S1-S4) présentent des rendements en huiles essentielles plus élevés (1,8 à 2,3%) que ceux prélevés à basse altitude et un climat sec (S5-S8), présentant des rendements plus faibles (0,6-1,2%) (**Tableau 4**).

L'analyse CPG et CPG-SM de l'huile collective (HE Coll) à partir des racines a conduit à l'identification de 3 composants : l'oxyde de carlina (86,2%), l'oxyde de 13-méthoxy carlina (5,3%) et l'acide hexadécanoïque (4,3%). Les 8 échantillons ont été analysés afin d'étudier la variabilité chimique des huiles essentielles de *C. caeruleus* d'Algérie. Les profils chromatographiques des échantillons étaient sensiblement identiques. Le composé acétylénique constituait la classe chimique dominante (75,3-96,1%) de la composition totale des huiles essentielles (**Tableau 5**). Ces résultats viennent confirmer les travaux antérieurs de Belabbes [136] qui montrent que l'oxyde de carlina est le produit majoritaire de *C. caeruleus*.

Tableau 5: Composition chimique de l'huile essentielle des racines de *C. caeruleus*

No. ^a	Composés	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	HE Coll	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	Identification ^e
1	Carlina oxyde	-	1580	2380	86.2	83.2	75.3	79.5	92.1	96.1	95,3	86,5	86,6	RI, MS
2	13-Méthoxy carlina oxyde	1798	1800	2104	5.3	2.1	8.6	6.5	1.2	0.1	1,2	6,5	6,5	RI, MS
3	Acide hexadécanoïque	1942	2005	1944	4.3	11.2	14.2	6.3	0.5	0.1	0,6	3,2	5,8	RI, MS
% Identification					95,8	96,5	98,1	92.3	93.8	96.3	97.1	96.2	98.9	

^a L'ordre d'éluion est donné sur la colonne apolaire (Rtx-1)). ^b Indices de rétention de la littérature sur la colonne apolaire (IRI). ^c Indices de rétention sur la colonne apolaire Rtx-1 (RIa). ^d Indices de rétention sur la colonne polaire Rtx-Wax (RIp). ^e RI : Indices de rétention ; MS : Spectres de masse en mode d'impact électronique. HE Coll : huile essentielle collective. Min: minimum. Max: maximum.

D'autre part, l'analyse de l'extrait d'hydrolat été caractérisé en plus des composés acétyléniques (70,2%) par une quantité appréciable de phytone (23,2%) et d'acide hexadécanoïque (2,5%) (**Tableau 6**).

Tableau 6: Composition chimique de l'extrait d'hydrolat (HY)

N ^a	Composés	IR ^b _a /Lit	IR _a ^c	IR _p ^d	HY	Identification ^e
1	Carlina oxyde	-	1580	2380	58.6	RI. MS. RMN
2	13-Méthoxy carlina oxyde	1798	1800	2104	11.6	RI. MS
3	Phytone	1844	1846	2131	23.2	RI. MS
4	Néophytadiene	1840	1851	1922	0.2	RI. MS
5	Acide hexadécanoïque	1942	2005	1944	2.5	RI. MS
% d'identification					96.1	

L'oxyde de Carlina a été isolé pour la première fois en 1889 [6] et a été signalé dans la famille des astéracées et en particulier, a été isolé dans les huiles essentielles de *Carlina acanthifolia*, *Carlinae radix* et *Carlina acaulis* [6,16]. Alors que l'oxyde de 13-méthoxy Carlina a été isolé en 1981 à partir des racines de *Carlina diae* [19]. Plusieurs études ont été menées sur les différentes activités biologiques apportées par ce composé qui a montré des activités antimicrobiennes, antitrypanosmiques, anti-inflammatoires et antiulcéreuses très prometteuses [19-24]. D'autre part, l'étude de Benelli et al [25] a montré que l'oxyde de carlina présente une certaine cytotoxicité non sélective vis-à-vis des cellules normales du derme humain et des lignées cellulaires tumorales. La toxicité de l'oxyde de Carlina est en partie due à l'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase [26,27]. Afin d'étudier les activités biologiques du produit majoritaire (l'oxyde de carlina) de cette plante, nous avons procédé à un fractionnement sur colonne de l'huile collective. L'oxyde de carlina a été séparé en utilisant une chromatographie

sur colonne de gel de silice en utilisant de l'hexane/EtOAc (3:1) comme éluant. La caractérisation spectrale de ce composé a été réalisée par les différentes méthodes d'analyses.

La caractérisation de l'oxyde de carlina a été réalisé par :

Spectrométrie de masse ; m/z : 182

Spectre IR (KBr, cm^{-1}): (C≡C) 2216; (C-H Ar) 3086; (C = C Ar) 1453, 1487, 1494, 1573; (C = C furano) 1603; (C-H, furano) 984; (C-H Ar) 740.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): 3,93 (2H, s, CH₂); 6,44 (1H, dd, J₁ = 3,24, J₂ = 1,8. CH furano); 6,62 (1H, d, J = 3,62. Furane C-H); 7,3-7,5 (6H, m, CH phényle + CH furano).

RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) δ : 143,05, 137,43, 135,99, 128,69, 128,06, 126,88, 114,32, 110,78, 92,04, 73,03, 25,87.

La comparaison des données de RMN du proton et du carbone-13 de notre composé avec ceux décrites dans la littérature [136] a conduit à la confirmation non ambiguë de l'oxyde de carlina.

4. Hémisynthèse des analogues de l'oxyde de carlina :

Compte tenu de la littérature, aucun travail n'a rapporté la synthèse d'analogues de l'oxyde de carlina et l'étude de leurs activités biologiques. L'objectif principal de cette partie de travail consisté à préparer par hémisynthèse quelques nouveaux analogues de l'oxyde de carlina.

4.1. Formylation de Vilsmeier-Haack

Notre intérêt général pour la préparation de nouveaux produits biologiquement actifs nous a incités à élaborer une voie de synthèse efficace vers des métabolites biologiquement actifs et à préparer de nouveaux analogues de carlina oxyde. La synthèse du composé (IM2) a été réalisée par la formylation de Vilsmeier-Haack. Le produit obtenu après la purification est d'un aspect huileux orange avec un rendement de 64 et 67% (méthode 1 et 2, respectivement).

Le produit est un mélange de 2 composés inséparables qui ont le même Rapport frontal ($R_f = 0.27$) (Schéma 16).

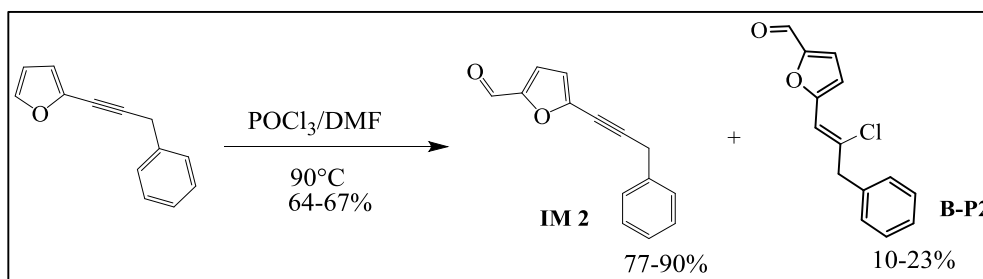


Schéma 16: Produits obtenus par formylation de Vilsmeier-Haack

Selon le mécanisme réactionnel (Schéma 17) on remarque la formation de HCl, ce qui a entraîné la formation du sous-produit B-P2 par hydrohalogénération sur la triple liaison.

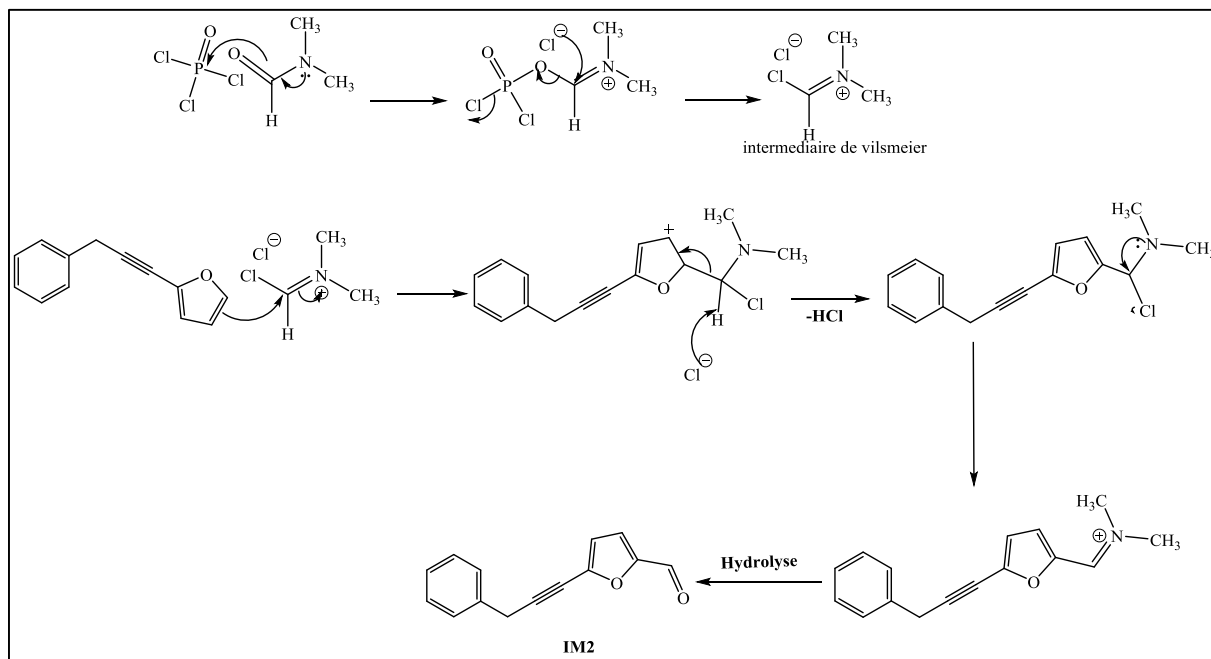


Schéma 17: Mécanisme réactionnel de la formylation de Vilsmeier-Haack

IM2: rendement : (méthode 1) : 49% . (Méthode 2): 60% ; IR spectre (KBr , cm^{-1}) : 1678 ($\text{C}=\text{O}$, Aldéhyde), 2825($\text{C}-\text{H}$, aldéhyde) , 2229 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1590, 1485; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz) : 9.64 (s,1H),7.42-7.30(m,5H) 7.25 (d, 1H J=3.6Hz), 6.70 (d, 1H, J = 3.6Hz), 3.92 (s, 2H, CH_2),. ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 177.19, 152.14, 142.19, 134.99, 128.81, 128.04, 127.14, 116.44, 112.35, 95.94, 72.22, 25.90.

B-P2 : rendement : (méthode 1): 15%; (méthode 2): 7% IR spectre (KBr , cm^{-1}) 697 ($\text{C}-\text{Cl}$). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz) : 9.64 (s, 1H),7.42-7.30(m, 5H ar + H furane), 7.16 (d, 1H, J = 3.9Hz), 6.57(s, 1H), 3.87 (s, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 177.31, 155.51, 150.81, 139.21, 136.07, 129.27, 128.86, 127.18, 123.24, 115.51, 112.61, 47.04.

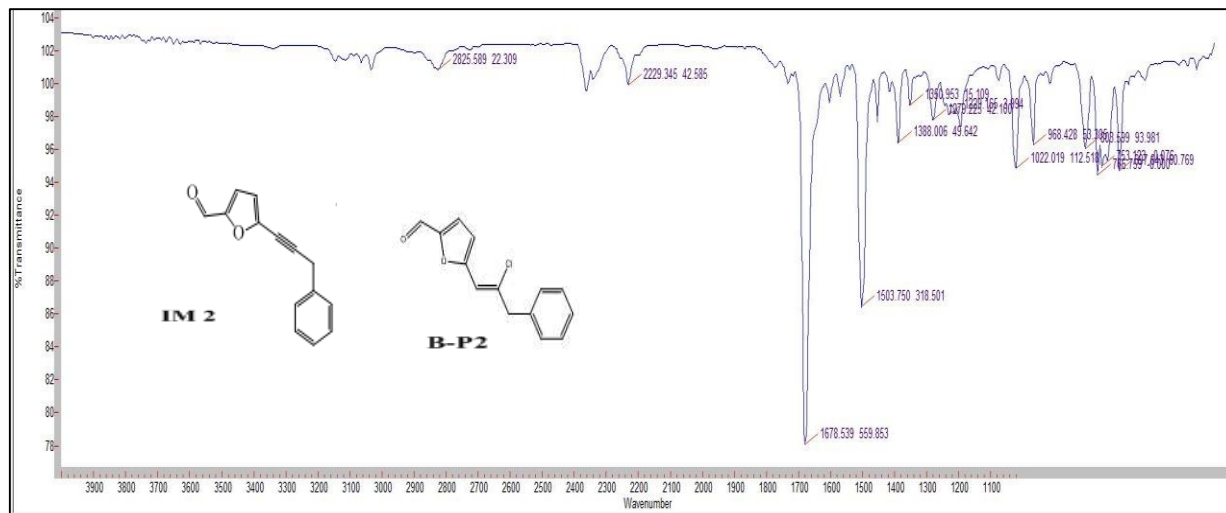


Figure 6 : Spectre IR (KBr, cm-1) du mélange IM2/B-P2

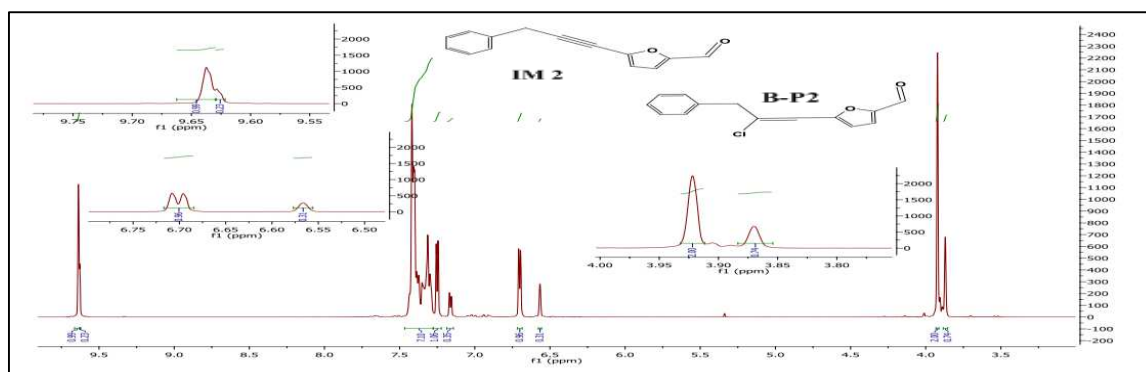


Figure 7: Spectre RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) du mélange IM2/B-P2

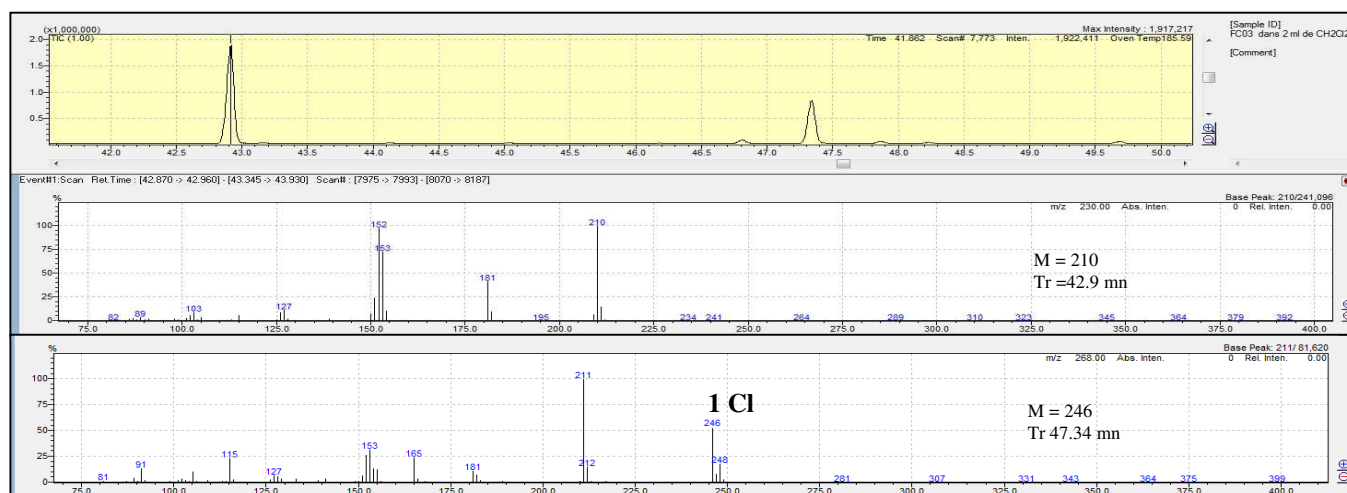


Figure 6: Chromatogramme et spectre de masse du mélange IM2/B-P2

4.2. Amination réductrice :

L'amination réductrice a été faite sur le mélange (produit et sous-produit) de formylation. L'amination réductrice de l'aldéhyde par le cyano-borohydrure de sodium avec les ester d'acide aminé a permis l'obtention des analogues IM8, IM9, IM10 et IM11 avec les sous-produits B-P8, B-P9, B-P10 et B-P11. La réaction de l'aldéhyde avec 3-(trifluorométhyl) aniline par le cyano- borohydrure de sodium nous a permis d'obtenir l'analogue IM12 avec le sous-produit B-P12. La réaction du mélange IM2/ B-P2 avec les anilines en présence du triacétoxyborohydrure de sodium afin d'obtenir les analogue IM5, IM6 et IM 7 n'a pas eu lieu.

(Schéma 18)

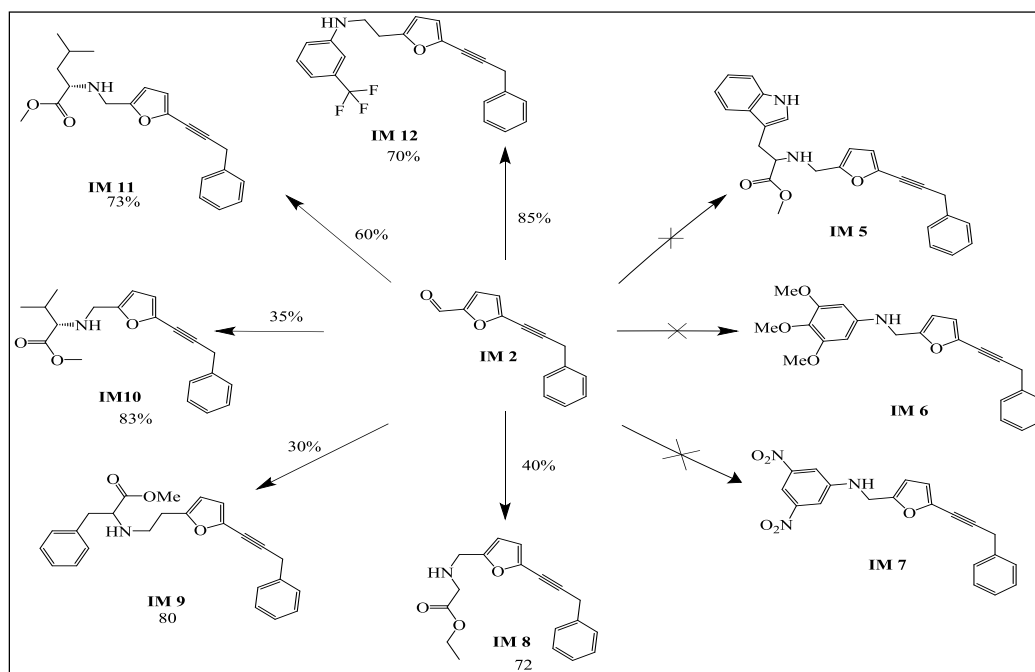


Schéma 18: Essais d'hemisynthèse de quelques analogues de carlina oxyde

Les sous-produits de chaque réaction n'ont pas pu être éliminés même après purification par colonne chromatographique à cause du même rapport frontal que celui du produit désiré. De ce fait pour chaque ester d'acide aminé ou aniline un sous-produit a été obtenu avec des pourcentages qui varient entre 17 et 30% (schéma 19).

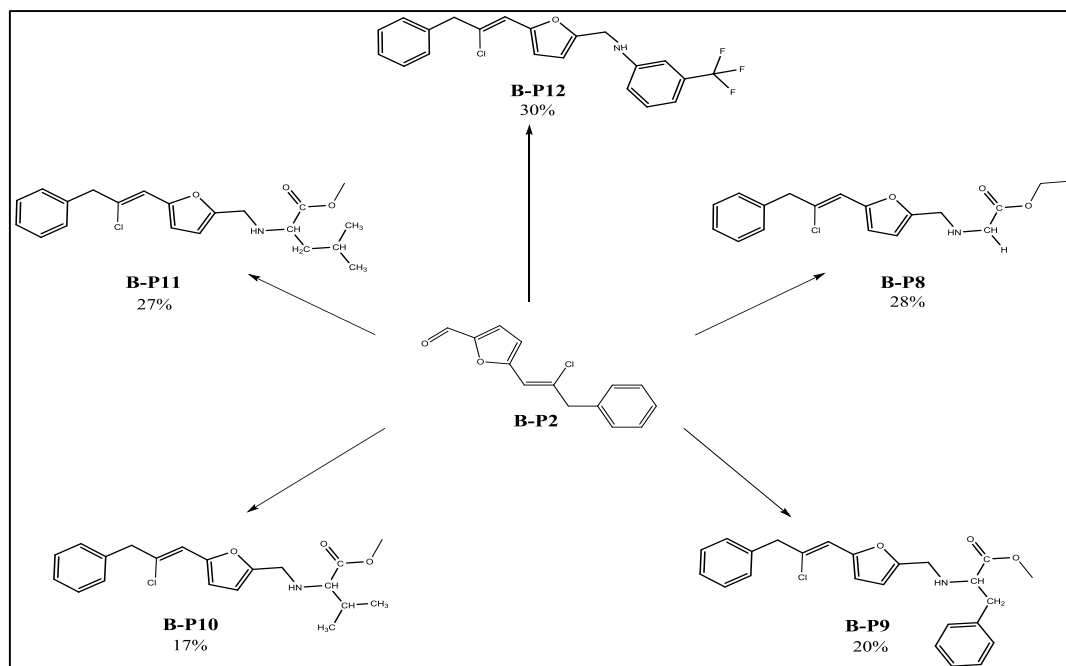


Schéma 19: Sous-produits de l'amination réductrice

L'amination réductrice comprend la formation d'un intermédiaire imine. Une fois que l'imine est formée, la liaison C=N peut être réduite. Dans des conditions acides, l'imine sera protonée pour donner son acide conjugué, un ion iminium. En présence d'un agent réducteur comme le NaBH_3CN , l'iminium sera réduit pour donner une nouvelle amine (Schéma 20).

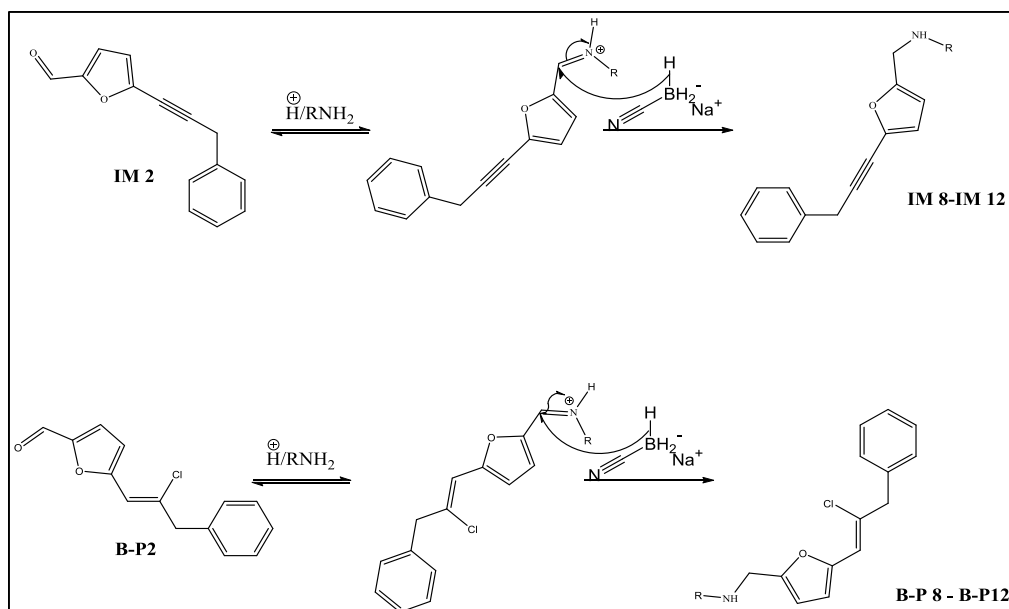


Schéma 20: Mécanisme réactionnel de la formation des produits de l'amination réductrice

L'avantage de l'utilisation du NaBH_3CN est le fait qu'il ne soit pas un agent réducteur assez puissant pour réduire l'aldéhyde, mais il est un nucléophile assez puissant pour réduire les ions iminium. Par conséquent, une plus grande partie de l'aldéhyde de départ sera convertie en amine

a. [[5-(3-Phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]-amino]-acetic acid ethyl ester (IM8)

Chlorhydrate Glycine éthyle ester a produit une huile orange 59.4 mg (40%) composée de IM8 et sous-produit B-P8. Rf : 0.26.

IM8: 72% IR spectre (KBr, cm^{-1}) 3340 (N-H), 2230 ($\text{C}\equiv\text{C}$). 1737 ($\text{C}=\text{O}$ ester), ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.27 – 7.44 (m, 5H), 6.50 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.23 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.08 (s, 1H), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 172.05, 153.80, 136.92, 136.80, 128.65, 128.03, 126.83, 115.05, 108.57, 92.05, 73.05, 60.90, 49.78, 45.66, 25.86, 14.24.

B-P8: 28%. IR spectre (KBr, cm^{-1}) 698 (C-Cl) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.27 – 7.44 (m, 5H), 6.89 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.30 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.08 (s, 1H), 1.32 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 172.11, 151.97, 149.97, 136.74, 131.80, 129.18, 128.65, 127.10, 116.11, 111.05, 109.7, 60.90, 49.72, 46.64, 25.86, 14.24.

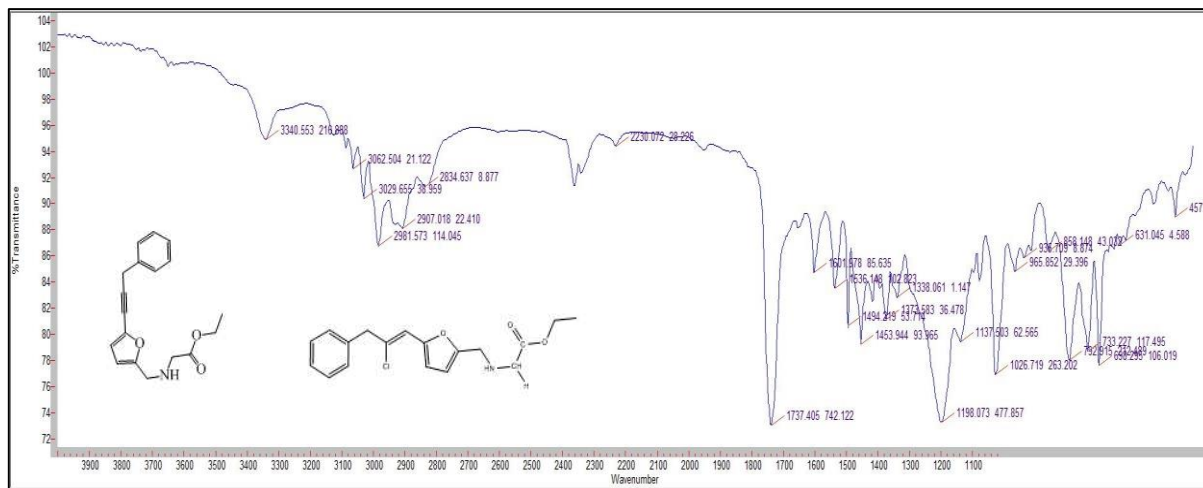


Figure 7: Spectre IR (KBr , cm^{-1}) du mélange IM8/B-P8

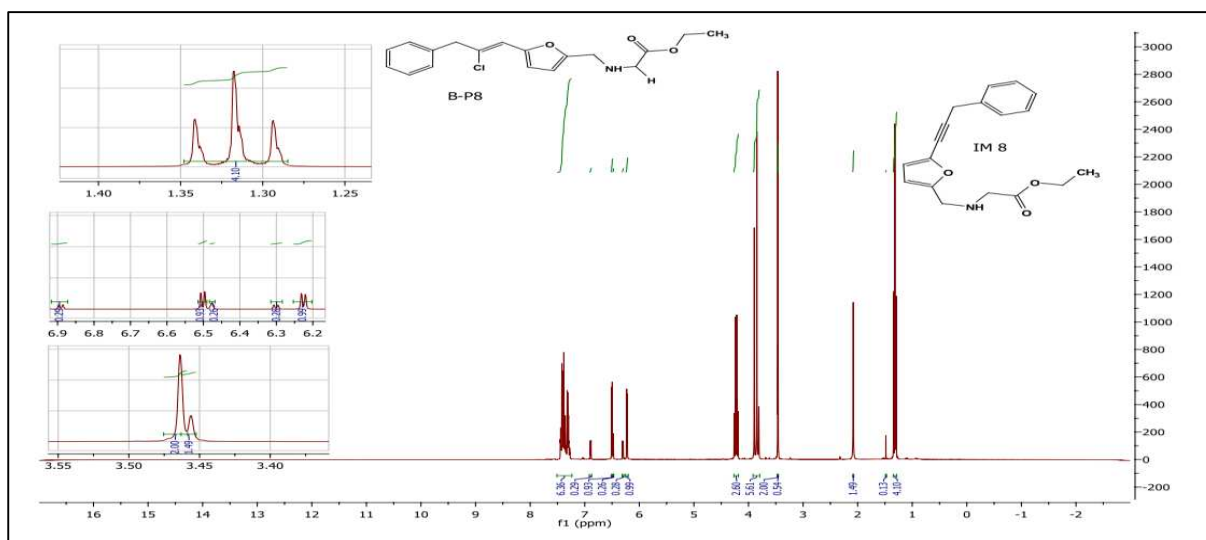


Figure 8: Spectre RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) du mélange IM8/B-P8

b. 3-Phenyl-2-[[5-(3-phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]-amino]-propionic acid methyl ester (IM9)

En utilisant le chlorhydrate de phénylalanine méthyl ester un mélange de IM9 et B-P9 a été obtenu. Aspect : huile orange avec un rendement de 30%. Rf : 0.35.

IM9 : 80%. IR spectre (KBr, cm⁻¹) 3338 (N–H), 2232 (C≡C).1734 (C=O ester) ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ, ppm (J, Hz): ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43 – 7.06 (m, 10H), 6.47 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.11 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.62 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.02 (d, *J* = 20 Hz, 2H) 2.01 (s, 1H). ¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 174.54, 153.82, 137.02, 136.65, 129.18, 128.67, 128.51, 128.05, 126.85, 115.06, 108.42, 91.98, 73.10, 61.79, 51.84, 44.78, 39.61, 25.89.

B-P9: 20%. IR spectre (KBr, cm⁻¹) 699 (C-Cl). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ, ppm (J, Hz): ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43 – 7.06 (m, 10H), 6.86 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.19 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 3.62 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.02 (d, *J* = 20 Hz, 2H) , 2.01 (s, 1H). ¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 174.51, 153.82, 137.02, 136.65, 135.98, 129.18, 128.52, 127.18, 126.85, 115.06, 111.06, 108.6, 61.79, 51.84, 44.79, 39.61, 25.89.

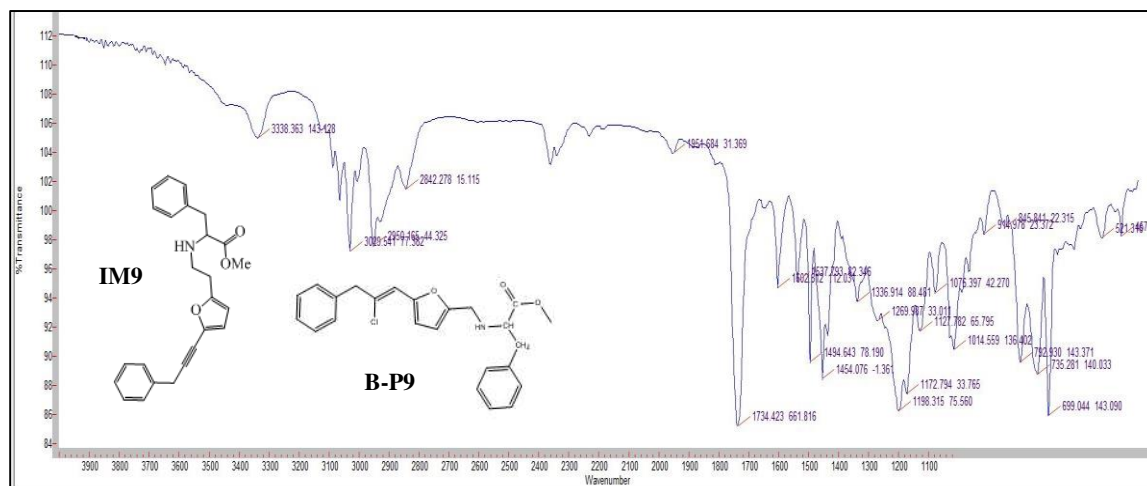


Figure 9: Spectre IR (KBr, cm^{-1}) du mélange IM9/B-P9

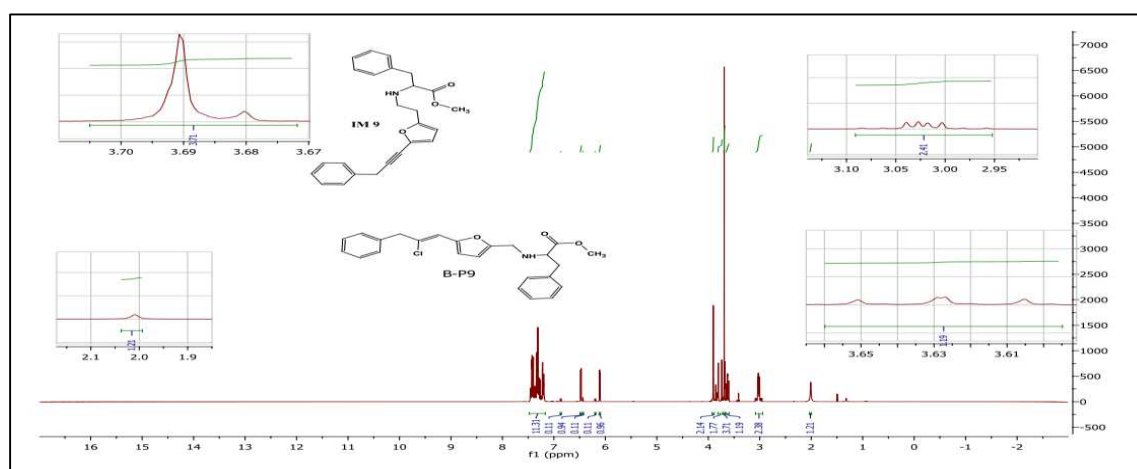


Figure 10: Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) du mélange IM9/B-P9

c. *3-Methyl-2-[[5-(3-phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]-amino]-butyric acid methyl ester (IM10)*

Une huile jaunâtre composée de IM10 et B-P10 a été obtenue en utilisant le chlorhydrate de Valine méthyle ester avec un rendement de 35%. Le sous-produit n'a pas pu être isolé puisqu'il possède le même rapport frontal que celui du produit désiré ($R_f = 0.26$).

IM 10: 83%. IR spectre (KBr, cm^{-1}) 3338 (N-H), 2232 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1734 ($\text{C}=\text{O}$ ester) ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz) : δ 7.42 – 7.30 (m, 5H), 6.50 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.11 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 1.98 (h, $J = 13.4$, 6.7 Hz, 1H+1H NH), 1.00 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 175.22, 154.41, 136.51, 136.00, 128.65, 128.04, 126.83, 115.11, 108.23, 91.90, 73.15, 66.42, 51.60, 45.45, 31.72, 25.88, 19.18, 18.56.

B-P10: 17%. IR spectre (KBr, cm^{-1}) 698 (C-Cl). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz) : δ 7.42-7.30 (m, 5H), 6.89 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.86 (s,

2H), 3.73 (s, 3H), 3.71 (s, 2H), 3.11 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 1.98 (h, $J = 13.4, 6.7$ Hz, 1H⁺1H NH), 0.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H). ¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ : 175.22, 152.57, 149.70, 137.10, 131.51, 129.16, 128.65, 127.08, 116.16, 111.10, 109.37, 66.26, 51.59, 46.65, 31.69, 25.88, 19.10, 18.60.

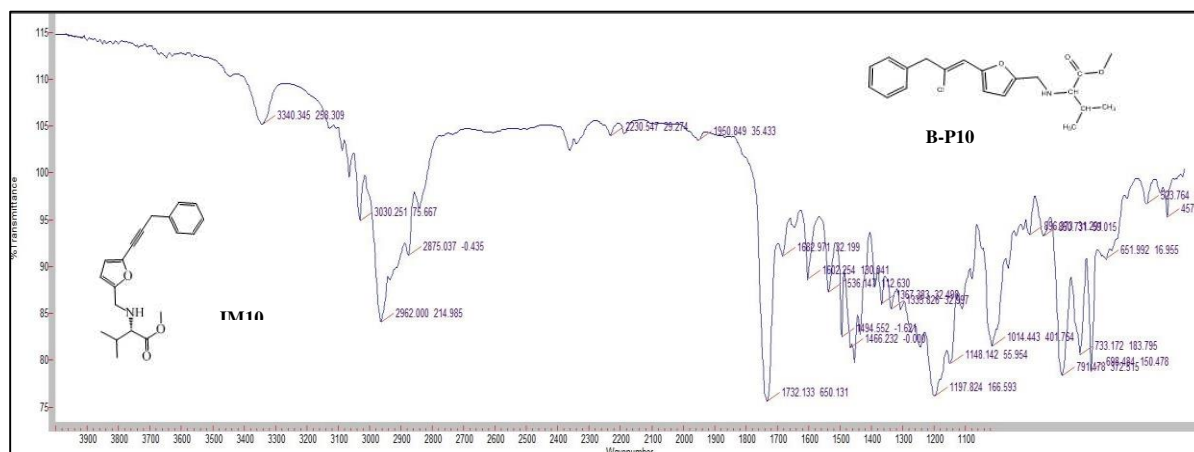


Figure 11: Spectre IR (KBr, cm⁻¹) du mélange IM10/B-P10

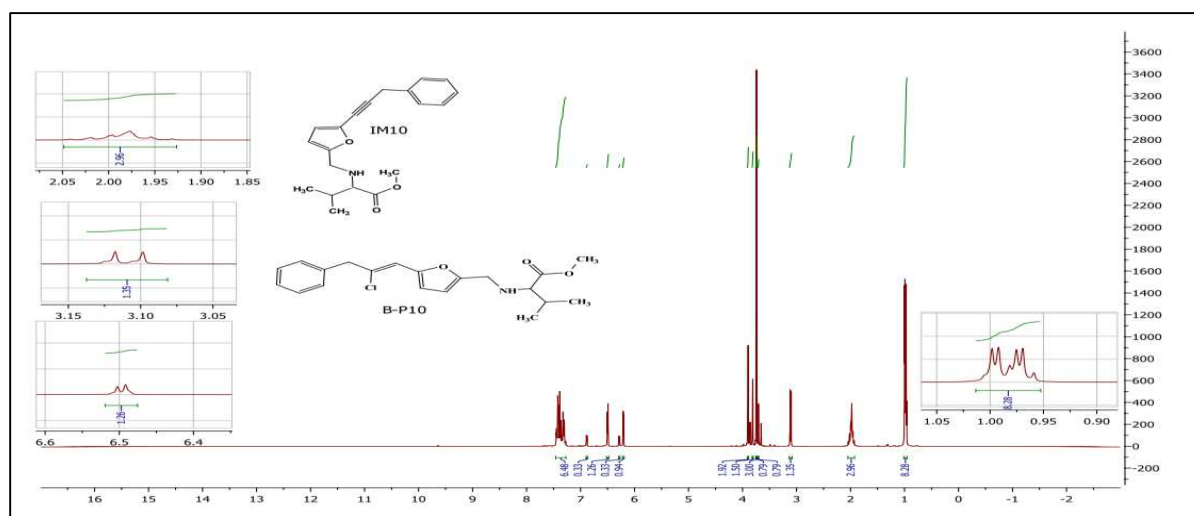


Figure 12: Spectre RMN 1H (CDCl₃, 300MHz) du mélange IM10/B-P10

d. *4-Methyl-2-[[5-(3-phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]-amino]-pentanoic acid methyl ester (IM 11)*

L'amination réductrice avec le chlorhydrate de Leucine méthyle ester a donné un mélange de deux composés IM11 et B-P11 sous forme d'une huile jaunâtre avec rendement de 60%. Le rapport frontal du IM11 et le même que celui du B-P11 ($R_f=0.49$).

IM11 : 73%. IR spectre (KBr, cm⁻¹) 3336 (N-H), 2230 (C≡C), 1733 (C=O ester). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 – 7.27 (m, 5H), 6.49 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.93 (s, 1H), 1.84 – 1.71 (m, $J = 13.1, 6.5$ Hz, 1H), 1.53 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.96 (d, $J = 1.9$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H). ¹³C

RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 176.02, 154.13, 136.60, 135.98, 128.64, 128.03, 126.83, 115.08, 108.34, 91.92, 73.12, 59.06, 51.80, 44.92, 42.75, 25.87, 24.86, 22.75, 21.20.

B-P11: 27%. IR spectre (KBr, cm^{-1}) 698 (C-Cl). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.42 – 7.27 (m, 5H), 6.49 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.93 (s, 1H), 1.84 – 1.71 (m, $J = 13.1, 6.5$ Hz, 1H), 1.50 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.96 (d, $J = 1.9$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 176.02, 152.28, 149.78, 137.08, 131.60, 129.17, 128.64, 127.08, 116.14, 111.8, 109.47, 58.97, 51.80, 46.64, 42.75, 25.87, 24.88, 22.71, 21.23.

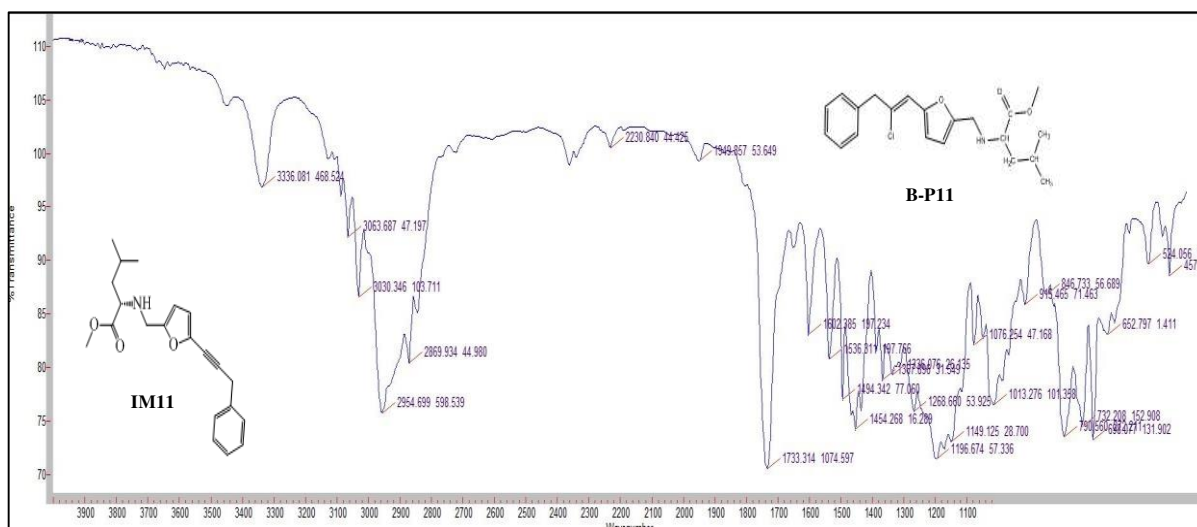


Figure 13: Spectre IR (KBr, cm^{-1}) du mélange IM11/B-P11

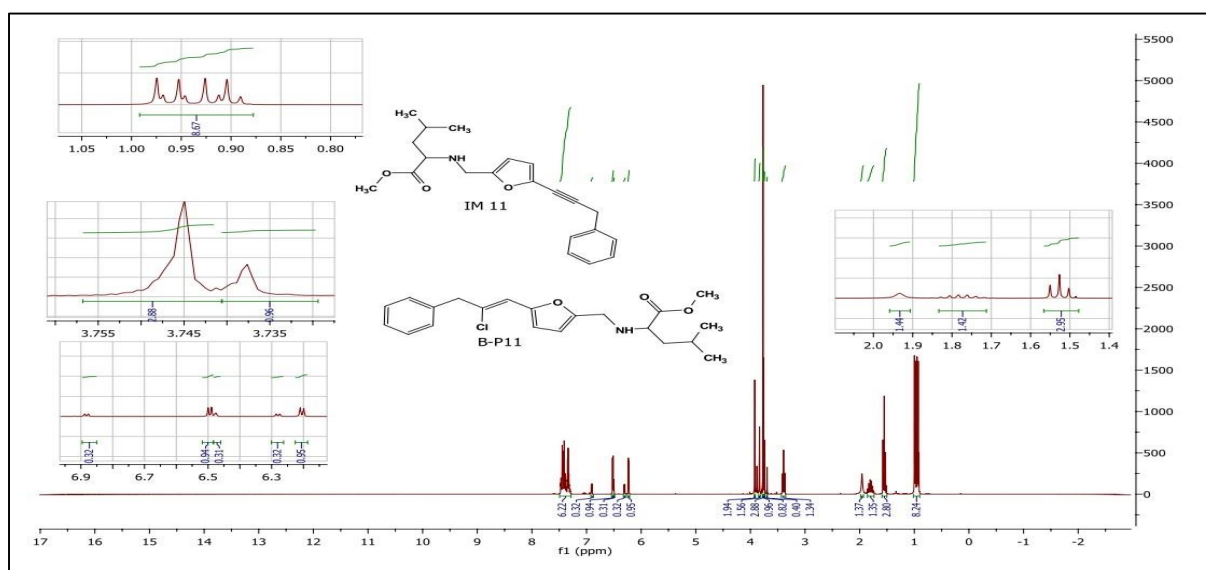


Figure 14: Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) du mélange IM13/B-P13

e. [5-(3-Phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]-(3-trifluoromethyl-phenyl)-amine (IM12)

Le mélange sous forme d'une huile orange a été obtenu en utilisant le 3-trifluorométhyl aniline comme produit de départ. Rendement : 85%. Le produit désiré ainsi que le sous-produit ont le même rapport frontal (Rf : 0.43).

IM12: 70 % .IR spectre (KBr , cm^{-1}) 3421 (N-H), 2230 (C≡C),1616 (C-F). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49 – 7.31 (m, 6H), 7.05 (dd, $J = 7.7, 0.5$ Hz, 1H), 6.96 – 6.92 (m, 1H), 6.86 (dd, $J = 7.2, 4.5$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.38 (s, 2H), 3.93 (s, 2H), ^1H RMN (282 MHz, CDCl_3) -62.70 (s). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 150.02, 147.53, 136.93, 135.90, 131.57, 129.74, 128.73, 128.06, 126.94, 124.37, 116.09, 115.26, 114.53, 111.30, 108.54, 92.47, 72.91, 41.24, 25.88.

B-P12: 30%. IR spectre (KBr, cm^{-1}) 696(C-Cl). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49 – 7.31 (m, 6H), 7.05 (dd, $J = 7.7, 0.5$ Hz, 1H), 6.96 – 6.94 (dd, $J = 7.2, 4.5$ Hz, 1H), 6.94 (m, 1H⁺ 1H furano), 6.51(s,1H), 6.38 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), , 4.38 (s, 2H), 3.85 (s, 2H). ^{19}F RMN (282 MHz, CDCl_3) -62.70 (s). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 152.47, 150.02, 147.65, 137.04, 132.75, 129.74, 129.20, 128.79, 127.17, 124.37, 116.09, 115.92, 114.53, 111.30, 109.4, 109.3, 41.20, 27.06.

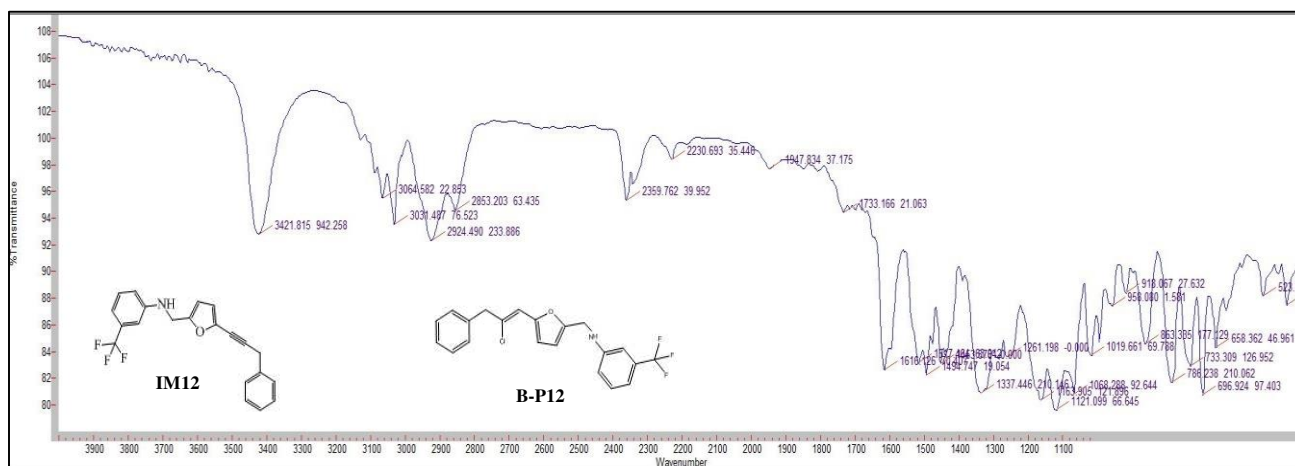


Figure 15: Spectre IR (KBr , cm^{-1}) du mélange IM12/B-P12

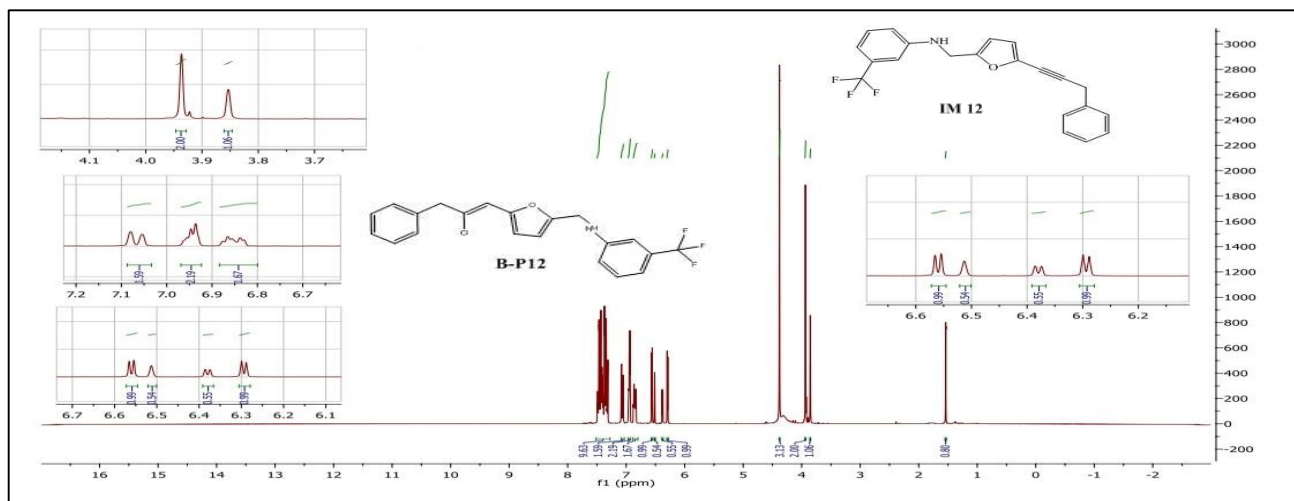


Figure 16: Spectre RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) du mélange IM12/B-P12

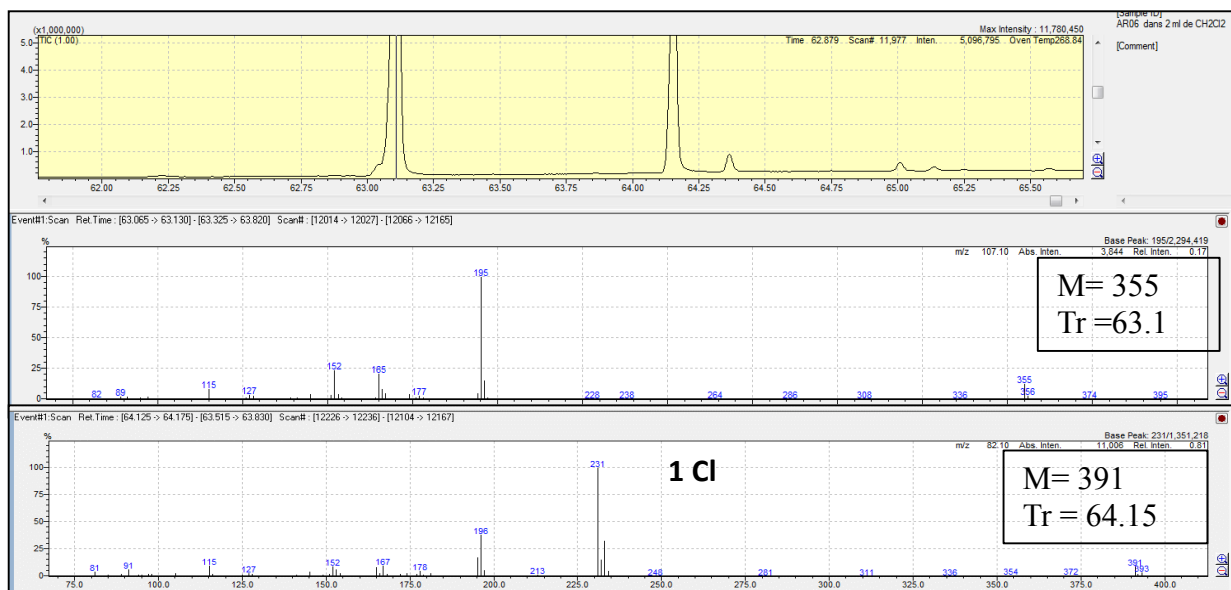


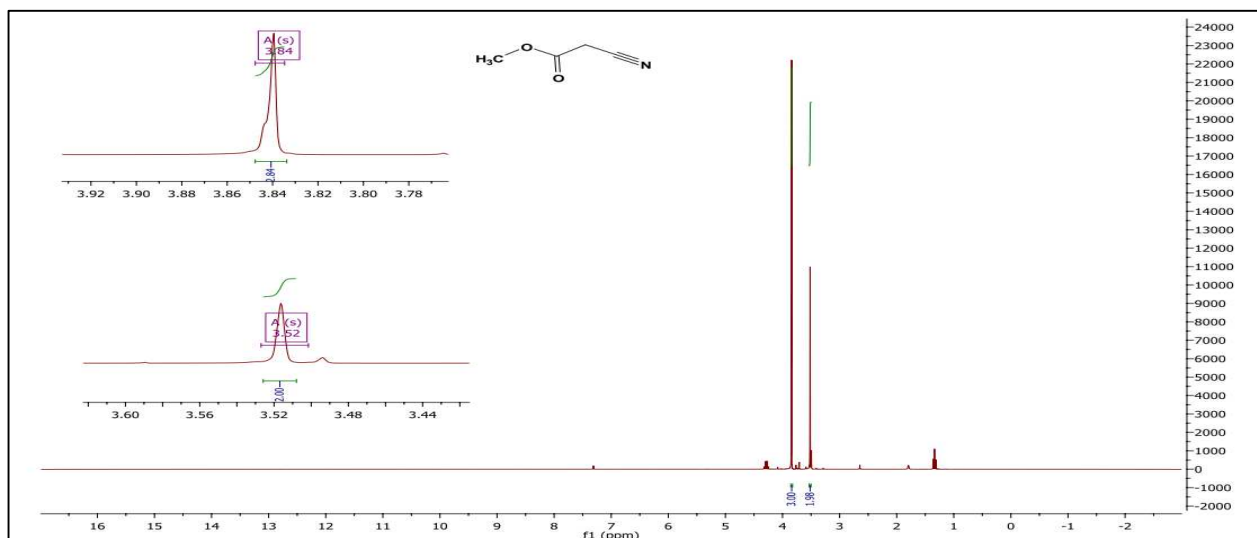
Figure 17: Chromatogramme et spectre de masse du mélange IM12 et B-P12

4.3. Condensation de Knoevenagel

Méthyl cyanoacetate

Le méthyl cyanoacetate utilisé pour la condensation de Knoevenagel a été préparé par estérification de l'acide cyanoacétique et a été obtenu sous forme d'un liquide transparent avec un rendement de 66%.

IR spectre (KB, cm⁻¹) 2230 (C=O), 1616 (C≡N). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) 3.84 (s, 3H), 3.52 (s, 2H), ¹³C RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 163.55, 113.14, 53.56, et 24.51.



➤ **Figure 18:** Spectre RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) du cyanoacetate de methyl
Methyl 2-cyano-3-(5-(3-phenylprop-1-yn-1-yl)furan-2-yl)acrylate IM13

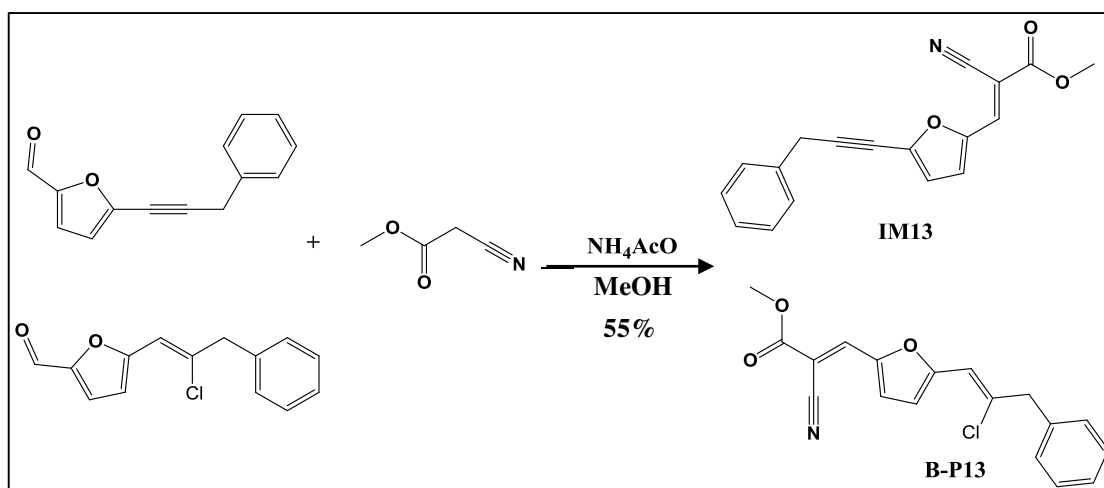


Schéma 22: Produits formés par condensation de Knoevenagel

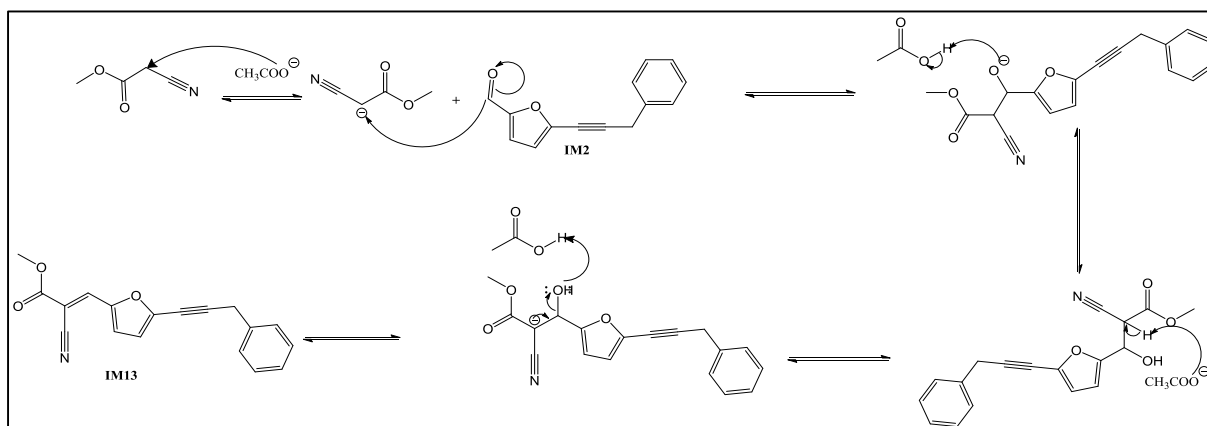


Schéma 21: Mécanisme réactionnel de la formation de l'analogue IM13

Chapitre III : Résultats et discussions

Le produit est obtenu sous forme d'un solide jaune composé d'IM13 et B-P13 avec un rendement de 55%. $T_f = 70^\circ\text{C}$. $R_f = 0.11$.

IM13: 89 %. IR spectre (KBr, cm^{-1}) 1612(C=C), 1722 (C=O), 2359 (C \equiv N). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.99 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.44 – 7.29 (m, 5H), 6.77 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.95 (s, 2H). ^{13}C RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 163.08, 148.32, 142.39, 138.63, 134.97, 128.82, 128.05, 127.14, 122.4, 117.97, 115.29, 114.27, 98.40, 97.29, 72.34, 53.34, 26.05.

B-P13: 11%. IR spectre (KBr, cm^{-1}) 698(C-Cl). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.98 (s, 1H), 7.44 – 7.29 (m, 7H), 7.20 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.88 (s, 2H).

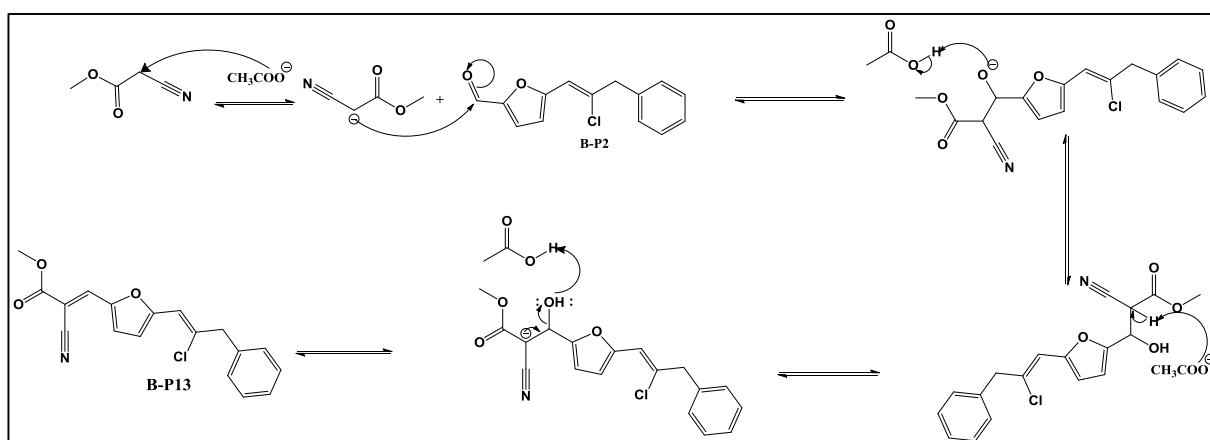


Schéma 23 : Mécanisme réactionnel de la formation du sous-produit B-P13

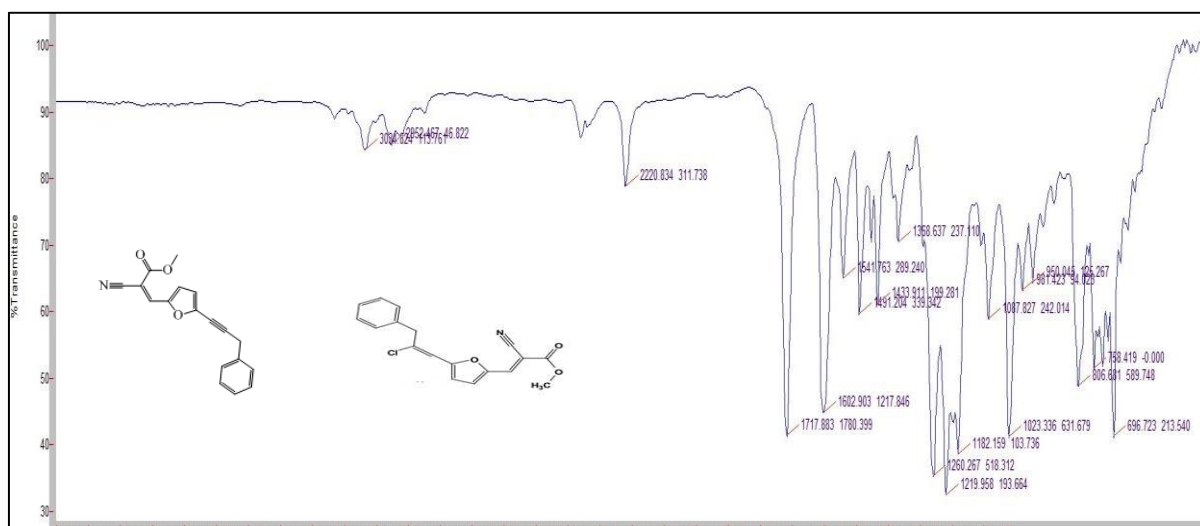


Figure 19: spectre IR (KBr , cm^{-1}) du mélange IM12/B-P12

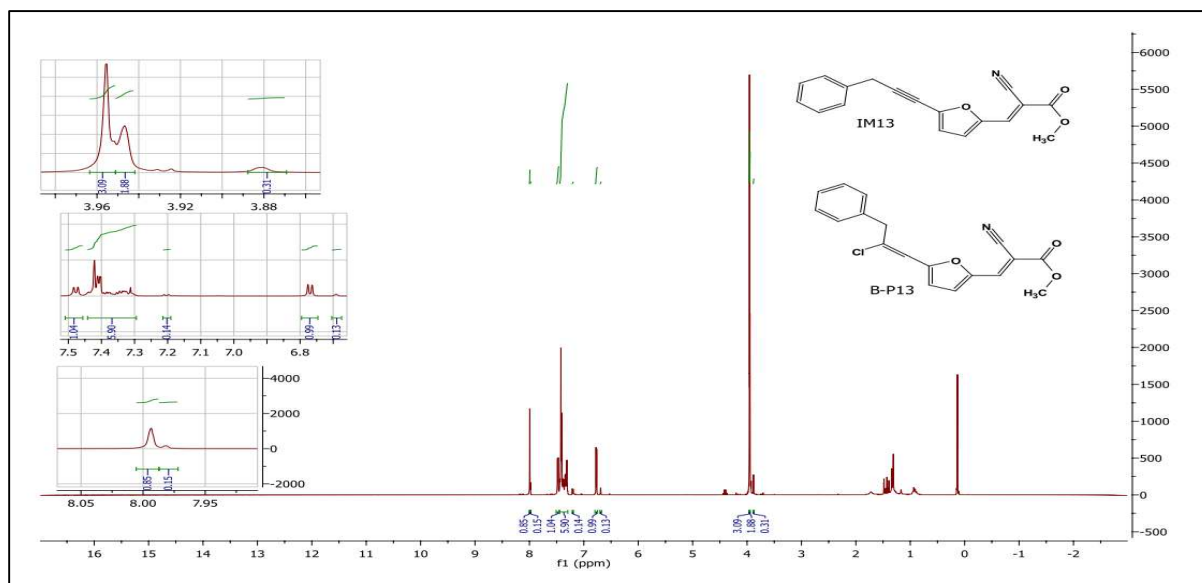


Figure 20: Spectre RMN 1H (CDCl₃, 300 MHz) du mélange IM13/B-P13

II. *Anacyclus valentinus*

La partie aérienne de *Anacyclus valentinus* est utilisée traditionnellement, c'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique de son huile essentielle. La récolte a été faite entre la fin du mois d'avril et début mai 2017 sur 11 stations près de Tlemcen.

Le genre *Anacyclus* appartient à la famille des astéracées de la tribu Anthemideae, qui est limitée à la région méditerranéenne et est particulièrement bien représentée dans les pays du Maghreb. Au total, neuf espèces et trois hybrides sont reconnus. L'*Anacyclus* est issu de deux mots latins « per circulum » qui signifie par anneaux en raison de la forme de ses fleurs.

1. Étude botanique et ethnobotanique :

A. valentinus ou anacycle de valence, communément appelé Guerthoufa ou Gritfa, est présent dans l'ouest du bassin méditerranéen (Maroc, Espagne, Algérie et Tunisie), sur des terrains perturbés, des endroits sablonneux et rocheux, des plaines, des berges de rivières, des champs et des bords de routes [119, 137]. Cette espèce est considérée comme un hybride entre *A. homogamos* et *A. radiatus* [137].

A. valentinus est caractérisée par une tige droite striée et velue qui s'élève jusqu'à 30 cm. Les feuilles paraissent de forme spatule multifides composées de folioles. Son pédoncule et involucre sont chargés de poile blanc. Sa fleur est assez grande, peu nombreuse et de couleur jaune. Sa période de floraison se situe entre Mars et Juillet [138].



Capitule *A. valentinus* (Tlemcen le 12.11.2018)



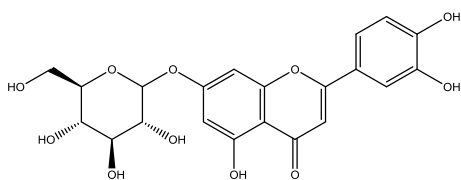
A. valentinus (Plantes de la France : décrites et peintes d'après nature -p27.1808)

Figure 21: Illustration *A. valentinus*

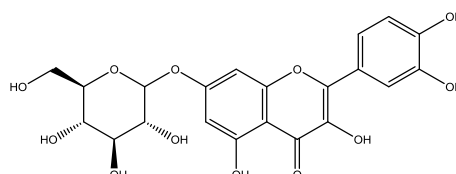
Les fleurs d'*A. valentinus* sont utilisées comme condiment alimentaire dans certaines régions du pays. La plante est également utilisée pour soulager les maux d'estomac [139].

2. Travaux antérieur

A. valentinus est une source riche en terpénoïdes et flavonoïdes tel-que Luteolin7-glucoside et Quercetin7-glucoside et peut avoir des activités biologiques intéressantes [140].



Luteolin7-glucoside (Cynaroside)



Quercetin7-glucoside

L'étude de l'activité antifongique menée par Houicher et Coll sur 7 souches suggère que l'huile essentielle de *A. valentinus* peut être utilisée comme un agent potentiel de contrôle biologique sûr pour prévenir les infections fongiques des cultures alimentaires [141].

Selon le travail réalisé par Lassouani et co, l'extrait aqueux d'*A. valentinus* est doté d'une remarquable activité antidiabétique, notamment sur l'hyperglycémie à jeun [142].

Une autre étude sur l'extrait méthanolique et l'huile essentielle d'*A. valentinus* révèle le pouvoir antibactérien de cette plante. ainsi qu'en combinaison avec des médicaments antibiotique, l'huile essentielle et l'extrait méthanolique peuvent être utilisés comme agent renforçant de l'activité antibiotique [139].

3. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle de *A. valentinus*

L'huile essentielle d'une couleur jaunâtre a été obtenue par hydrodistillation de la matière sèche. Les rendements en huiles essentielles des différents sites sont indiqués dans le tableau 7.

Tableau 7: Données relatives aux lieux de récolte de *A. valentinus*

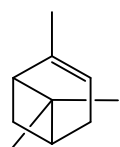
Nom de la station	Coordonnée		Altitude (m)	Rendement de l'huile essentielle
	Latitude	Longitude		
S1	34° 52' 50,756" N	1° 19' 47,161 O	689	0,043%
S2	34° 51' 51,948"N	1° 20' 5,427" O	936	0,01%
S3	35° 0' 24,304" N	1° 32' 53,041" O	189	0,007%
S4	34° 52' 7,138" N	1° 9' 32,184" O	803	0,056%
S5	34° 57' 5,89" N	1° 22' 21,817" O	476	0,014%
S6	34° 52' 1,248" N	1° 11' 6,379" O	896	0,099%
S7	34° 54' 6,264" N	1° 16' 48,55" O	660	0,044%
S8	34° 53' 51,173"N	1° 14' 3,411" O	846	0,006%
S9	34° 52' 47,532"N	1° 21' 30,479" O	702	0,004%
S10	34° 47' 46,464"N	1° 21' 37,875" O	1171	0,035%
S11	34° 55' 41,934"N	1° 22' 5,952" O	476	0,025%

Les rendements en huiles essentielles varient de 0,006 à 0,099 %. Ce qui nous a permis conclure que le rendement en huile essentielle peut être fortement affecté par le climat de la région (**Tableau 7**).

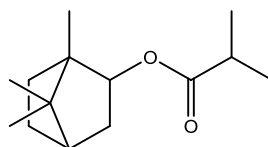
L'analyse des huiles essentielles de *A. valentinus* provenant de 11 sites (**Tableau 7**) a permis l'identification de 58 composés, représentant 59,5-90,4 % des huiles. Les composés ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse (EI-MS) et leurs indices de rétention (IR) avec ceux de la bibliothèque spectrale de masse. 31 monoterpènes, 21 sesquiterpènes, 5 composés non-terpéniques et un diterpène ont été identifiés.

Les huiles essentielles de *A. valentinus* étudiée sont principalement constituées de composés sesquiterpènes oxygénés (23.1-44.5%), accompagnés des sesquiterpènes hydrocarbonés (11.1-20.6%), monoterpènes oxygénés (8.0-23.8%) et des monoterpènes hydrocarbonés (0.7-13.2%) (**Tableau 8**).

Les monoterpènes sont constitués de 9 monoterpènes hydrocarbonés, dont l' α -pinène est le composé majoritaire présent dans les sites S2, S10 et S11. 22 monoterpènes oxygénés sont présents avec le Bornyl isobutyrate comme majoritaire pour la plupart des stations (**Tableau 8**).

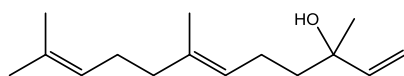


α -pinene

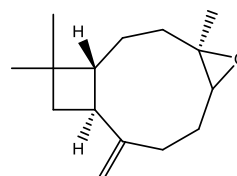


Bornyl isobutyrate

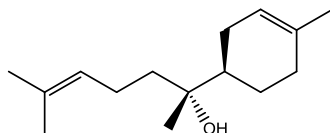
Les 21 sesquiterpènes identifiés, comportent 16 oxygénés avec le Nerolidol, epi- α -bisabolol, α -eudesmol et Caryophyllene oxyde comme composants majoritaires et 5 hydrocarbonés, représentés majoritairement par le E- β -Farnesene et Zingiberene (**Tableau 8**).



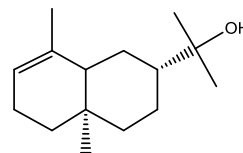
Nerolidol



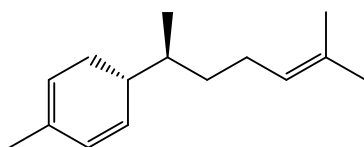
Caryophyllene oxide



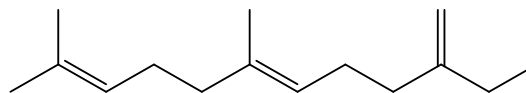
epi- α -bisabolol



α -eudesmol



Zingiberene



E- β -Farnesene

Les composés non terpéniques sont des alcanes linéaires tel que l'heneicosane ou des composés oxygénés (3-Octanol et décanal) (**Tableau 8**).

Tableau 8: Composition chimique des huiles essentielles de *A. valentinus* des divers sites de récolte

N°	Composés	IRI	IR _{ap}	Ir _{pol}	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	Identification
1	α-Pinène	931	932	1024	6.7	tr	1.1	0.6	0.1	tr	0.1	0.2	0.2	4.6	7.1	RI, MS
2	Camphène	943	943	1067	tr	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	tr	0.2	0.1	0.1	tr	RI, MS
3	6-Methyl-hept-r-en-2-one	963	960	1338	0.2	tr	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.4	0.1	0.1	tr	RI, MS
4	Sabinène	964	964	1122	tr	0.5	0.3	0.6	tr	1.2	0.1	1.2	0.8	0.8	0.6	RI, MS
5	β-Pinène	970	969	1110	0.3	tr	tr	1.1	0.1	0.1	0.3	tr	1.1	0.9	0.9	RI, MS
6	Myrcène	979	979	1158	0.6	1.1	0.1	0.8	0.1	0.3	tr	0.1	0.8	0.6	0.9	RI, MS
7	3-Octanol	986	981	1382	tr	tr	0.1	tr	tr	tr	tr	0.1	0.1	tr	tr	RI, MS
8	p-Cymène	1009	1011	1266	0.4	0.2	0.2	0.3	0.2	tr	0.3	tr	0.9	0.9	0.5	RI, MS
9	1,8-Cinéol	1020	1019	1156	tr	0.2	0.3	0.4	0.1	0.5	0.1	0.4	0.3	1.5	0.3	RI, MS
10	Limonène	1023	1022	1197	1.3	0.2	1.3	1.2	0.4	0.2	0.1	0.6	0.5	5.2	3.5	RI, MS
11	Artémisia cétone	1047	1047	1356	tr	0.3	0.4	0.9	0.4	0.6	tr	0.7	1.2	tr	0.6	RI, MS
12	γ-Terpinène	1047	1047	1245	tr	0.9	0.2	1.2	0.4	tr	0.1	0.1	0.5	tr	0.2	RI, MS
13	Nonanal	1075	1083	1375	tr	tr	0.3	1.5	tr	0.2	0.1	tr	0.7	0.6	0.5	RI, MS
14	Linalool	1082	1081	1553	0.5	0.3	0.4	1.1	0.6	0.3	0.2	0.4	1.1	0.7	0.4	RI, MS
15	α-Thujone	1089	1089		0.5	0.4	0.9	0.4	2.2	0.4	2.6	0.6	0.8	0.4	1.7	RI, MS
16	β-Thujone	1103	1103		0.4	0.9	0.2	0.5	0.7	0.8	tr	2.3	0.6	2.9	3.1	RI, MS
17	trans-Chrysanthénol	1102	1105		0.3	0.5	0.1	0.6	0.6	0.1	0.8	1.2	0.7	0.6	0.7	RI, MS
18	Trans-Pinocarvéol	1122	1125		0.3	0.3	tr	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0.6	0.5	0.3	RI, MS
19	Bornéol	1140	1148	1698	tr	0.5	0.1	0.7	0.2	0.2	1.1	0.4	0.6	1.5	0.5	RI, MS
20	Terpinène-4-ol	1161	1161		0.2	0.5	0.7	1.8	1.4	0.3	0.2	1.3	0.8	0.6	0.3	RI, MS
21	Butyrate d'hex(3z)ényle		1165		0.9	0.2	0.1	0.1	tr	0.1	0.9	0.4	tr	0.7	tr	RI, MS
22	Myrténal		1172	1628	0.5	0.3	tr	0.4	0.1	tr	0.5	1.1	0.2	0.5	tr	RI, MS
23	Terpinéol	1187	1179	1700	0.3	0.3	0.4	0.9	0.3	0.3	0.2	0.4	0.5	0.6	0.2	RI, MS
24	Décanal		1185	1498	tr	0.4	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.8	1.2	0.5	0.2	RI, MS
25	Acétate de fenchyle		1212	1468	0.3	0.5	0.4	0.6	0.5	0.8	0.1	4.3	1.3	1.8	0.3	RI, MS
26	Acétate de chrysanthényle	1222	1222	1557	0.4	0.4	0.1	0.4	0.5	0.3	0.2	0.5	0.6	0.9	0.2	RI, MS
27	Pipéritone		1232	1730	tr	0.4	0.1	0.5	0.2	0.7	0.4	0.3	0.8	0.5	0.2	RI, MS
28	Acétate de bornyle	1269	1269	1575	0.3	0.3	0.4	0.3	1.1	2.2	0.7	0.4	1.2	0.5	0.3	RI, MS
29	p-Mentha-1(7)-5-dièn-2-yl		1305	1727	tr	0.3	0.2	0.5	tr	0.3	0.4	1.5	0.6	0.2	0.2	RI, MS
30	Acétate de néryle	1342	1342	1725	0.3	0.5	1.2	0.8	4.9	0.2	0.6	1.3	2.2	0.6	0.7	RI, MS
31	Acétate de géranyle	1361	1361	1752	0.9	0.9	1.5	3.6	2.1	1.1	1	1.2	1.3	1.5	1.4	RI, MS
32	Propionate de bornyle	1358	1363	1627	0.3	0.9	0.6	0.4	0.4	0.1	0.3	1.7	0.3	0.8	0.4	RI, MS
33	Isobutyrate de bornyle	1404	1404	1627	2.1	2.5	0.3	1.8	5.2	1.1	2.8	3.3	1.8	2.1	3.9	RI, MS
34	E-β-Caryophyllène	1424	1424	1591	3.5	1.1	3.6	5.2	0.9	3.9	2.2	2.1	2.4	2.6	1.8	RI, MS

Chapitre III : Résultats et discussions

35	E- β -Farnesène	1445	1448	1661	3.1	2.8	6.2	5.1	4.9	7.2	6.4	2.5	1.1	4.5	9.1	RI, MS
36	γ -Curcumène	1475	1474	1682	0.5	5.6	0.4	0.3	0.6	2.8	0.5	1.5	1.4	2.1	0.7	RI, MS
37	Zingiberène	1489	1489	1717	4.7	2.4	9.4	9.6	2.6	9.3	5.2	2.1	7.7	5.9	1.5	RI, MS
38	β -Sesquiphallandrène	1523	1516	1765	1.2	1.3	0.8	0.4	2.1	0.9	2.6	0.6	2.1	2.2	0.7	RI, MS
39	Nerolidol	1546	1546	2037	1.3	1.1	6.2	0.6	0.1	1.1	2.2	5.8	0.7	1.1	0.8	RI, MS
40	Spathulenol	1557	1557	2119	1.1	1.6	0.9	1.2	1.6	1.2	0.8	1.6	2.1	1.5	1.1	RI, MS
41	Epiglobulol		1558	2013	1.2	1.3	0.9	1.3	1.7	1.3	0.9	1.7	2.2	1.6	1.2	RI, MS
42	Isovalérate de néryle		1568	1872	2.4	2.7	2.1	2.5	3.3	2.6	1.8	3.3	4.4	3.2	2.3	RI, MS
43	Oxyde de caryophyllène	1576	1576	1983	2.4	2.2	5.5	5.1	4.3	5.7	3.8	4.1	2.8	3.5	5.5	RI, MS
44	Isovalérate de géranyle		1586		0.6	0.6	1.4	1.2	1.1	1.5	0.9	1.1	0.7	0.9	1.4	RI, MS
45	1,10-diepi-Cubénol	1601	1608	2031	1.1	1.4	2.4	2.1	1.8	2.5	1.6	1.8	1.2	1.5	2.3	RI, MS
46	Valérate de néryle	1616	1616	1950	0.8	0.8	1.9	1.5	1.3	1.9	1.2	1.3	0.9	1.1	1.7	RI, MS
47	epi-Cubénol	1624	1624	2059	0.7	0.6	1.6	1.4	1.3	1.8	1.2	1.2	0.8	1.1	1.6	RI, MS
48	tau Cadinol	1632	1632	2169	2.5	2.8	3.3	3.2	3.2	5.1	5.9	1.6	3.2	4.9	3.1	RI, MS
49	β -Eudesmol	1644	1644	2232	3.1	3.4	3.3	2.7	2.4	2.5	5.1	3.6	2.9	6.9	1.6	RI, MS
50	α -Eudesmol	1653	1653	2220	3.5	3.5	4.2	8.1	1.1	2.5	1.3	4.7	8.1	0.6	1.8	RI, MS
51	Valérianone	1664	1664		0.5	1.1	4.6	3.1	3.2	0.8	2.2	0.9	2.5	0.7	3.2	RI, MS
52	α -Bisabolol	1672	1672	2217	1.2	tr	3.5	3.1	1.1	1.8	2.2	1.7	2.6	0.5	0.9	RI, MS
53	Eudesm-4(15)-7-dièn-1b-ol	1674	1672	2347	0.8	tr	1.1	0.5	0.7	1.2	1.4	1.1	1.5	1.4	0.6	RI, MS
54	epi- α -Bisabolol	1677	1677	2214	2.4	tr	1.6	1.1	2.1	7.3	7.4	6.4	1.1	1.2	1.6	RI, MS
55	(E)-Phytol	2114	2119	2578	1.8	2.3	1.3	2.6	0.4	1.4	2.7	0.9	5.6	0.6	4.5	RI, MS
56	Heneiscosane	2300	2300	2300	1.1	1.2	2.4	1.4	1.2	1.2	0.9	0.8	4.3	0.3	1.2	RI, MS
57	Triacotane	2500	2500	2500	tr	tr	0.7	0.3	3.2	0.1	3.1	0.1	2.1	0.3	0.5	RI, MS
58	Tétracotane	2700	2700	2700	tr	6.5	0.1	0.1	6.1	0.1	3.5	0.6	1.5	0.1	0.1	RI, MS
% Identification					59.5	61.1	81.7	88.6	76.1	80.8	81.8	81.0	90.4	84.0	80.9	
Monoterpène hydrocarbonés					8.9	2.8	3.1	5.7	1.2	2.1	0.7	2.4	4.0	12.2	13.2	
Monoterpènes oxygénés					8.0	11.4	8.5	17.2	22.2	10.4	12.8	23.8	18.4	19.6	16.2	
Sesquiterpènes hydrocarbonés					13.0	13.2	20.4	20.6	11.1	24.1	16.9	8.8	14.7	17.3	13.8	
Sesquiterpène oxygénés					25.6	23.1	44.5	38.7	30.3	40.8	39.9	41.9	37.7	31.7	30.7	
Diterpènes oxygénés					1.8	2.3	1.3	2.6	0.4	1.4	2.7	0.9	5.6	0.6	4.5	
Composés non-terpénique					2.2	8.3	3.9	3.8	10.9	2.0	8.8	3.2	10.0	2.6	2.5	

4. Variabilité chimique des huiles essentielles de *A. valentinus*

Les 11 échantillons ont été analysés afin d'étudier la variabilité chimique des huiles essentielles de *A. valentinus*. Pour cela, une matrice reliant les compositions des huiles essentielles aux lieux de récolte des échantillons a été soumise à une analyse en composantes principales (ACP) et une classification hiérarchique ascendante (CHA, dendrogrammes). Le dendrogramme obtenu suggère qu'il existe deux groupes principaux des huiles *A. valentinus* subdivisés en deux sous-groupes (**Figure 24**). Le premier groupe (I) comprend des échantillons des huiles provenant de quatre localités (S1, S2, S10 et S11), le second groupe comprend les échantillons des localités (S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9) et le group IV comprend les échantillons de deux localités (S5 et S8), (**Figure 23**).

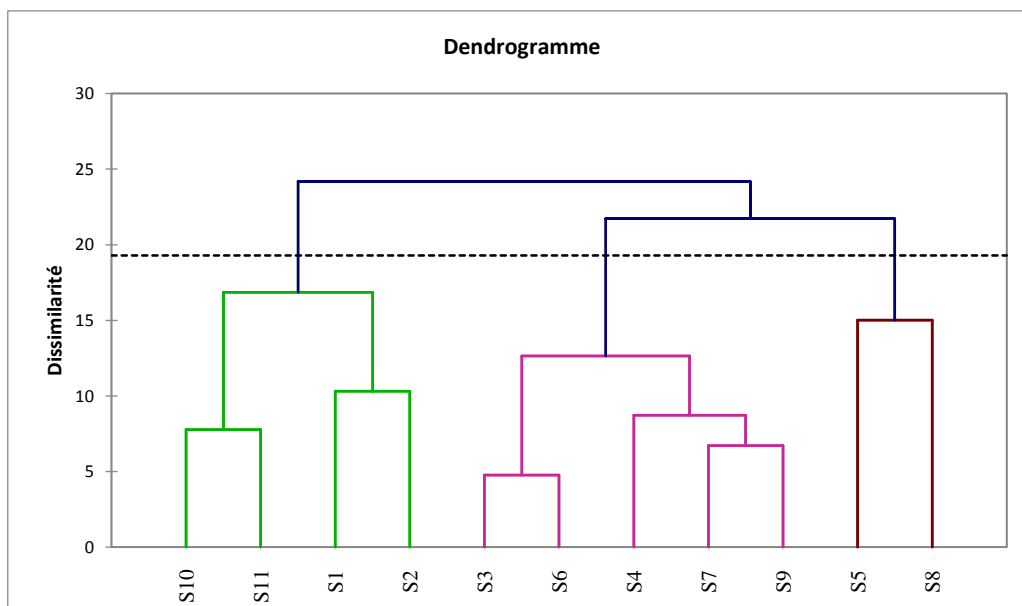


Figure 22: CHA des compositions chimiques de l'huile essentielle de *A. valentinus*

L'analyse des composants principaux (ACP) a été utilisée pour évaluer les relations entre les familles des composés et les conditions environnementales. Les résultats de l'ACP ne correspondaient pas à ceux obtenus en analyse par grappes (CA). Les deux premiers axes de l'ACP représentaient respectivement 30,41 et 26,45 % de la variance totale qui a été très faible et par conséquent aucune variabilité chimique n'a été observée pour les huiles essentielles de cette plante.

A titre indicatif la figure 25 représente l'ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *A. valentinus* ou les stations (S1 à S11) sont réparties d'une façon très hétérogène en fonction des groupes.

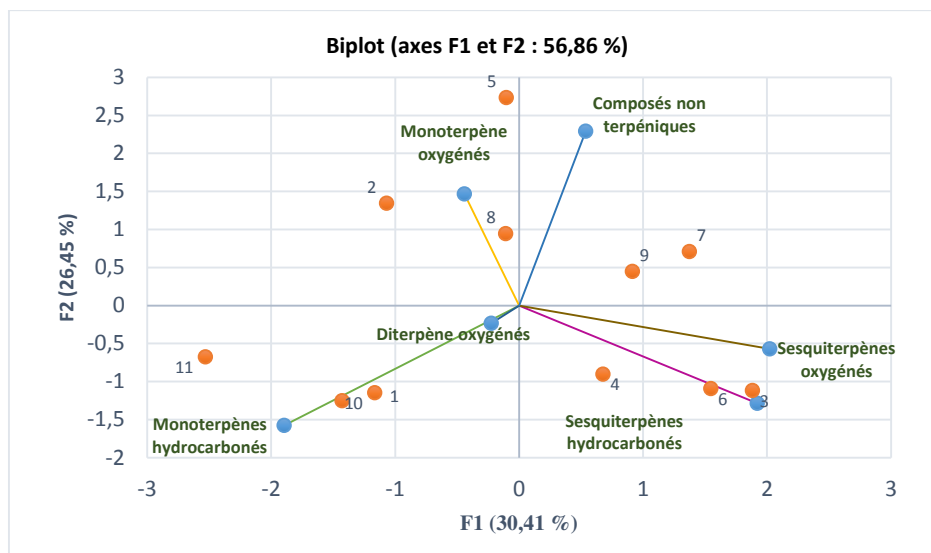


Figure 23: ACP des compositions chimiques des huiles essentielles de *A. valentinus*

5. Composition chimique de la fraction polaire de l'huile essentielle de *A. valentinus*

L'huile essentielle de *A. valentinus* a été séparé en deux fractions, la fraction hydrocarbonée a été obtenue par une élution au pentane à 100% tandis que la fraction oxygénée a été obtenue par l'éther diéthylique (100 %). Dans cette partie de travail, on s'est intéressé à l'étude de la deuxième fraction. De ce fait la composition chimique a été déterminée par CPG/SM en comparant les indices de rétention avec ceux de la littérature (**Tableau 9**)

Tableau 9: Composition chimique de la fraction oxygénée de HE d'*A. valentinus*

N°	Composés	IRI	IR _{ap}	IR _{pol}	S1
1	3-Octanol	986	981	1382	10,5
2	1,8-Cinéol	1020	1019	1156	19,5
3	Linalool	1082	1081	1553	23,5
4	Bornéol	1140	1148	1698	0,6
5	Terpinèn-4-ol	1161	1161	/	1,6
6	Hex(3z)enyl butyrate	1184	1165	1182	5,4
7	Décanal	1496	1185	1498	13,2
8	Caryophyllène oxyde	1576	1571	1980	9,2
9	Hexadecanol	1864	1869	1944	4,2
10	Acide Héxadécanoïque	1942	1956	2004	6,5
% Identification					94,2
Monoterpènes oxygénés					45,2
Sesquiterpènes oxygénés					9,2
Composés non-terpéniques					39,8

La fraction polaire est composée majoritairement des monoterpènes oxygénés (45.2%) et des composés non-terpéniques (39.8%), suivie de sesquiterpènes oxygénés (9.2%). 2 composés supplémentaires ont été identifiés, il s'agit de l'hexadecanol, et l'acide hétérocyclique.

Les monoterpènes oxygénés comprennent en majeure partie du linalool à 23.5%, alors que ce composé n'existait dans l'huile qu'à de faible pourcentage (0.2-1.1%) selon la station, ceci s'explique par le fait que lors du fractionnement les composés sont concentrés dans la fraction. Les sesquiterpènes oxygénés comportent le caryophyllène oxyde majoritairement avec 9.2%. La fraction oxygénée est composée du décanol qui est un composé non-terpénique avec un pourcentage important (13.2%).

III. *Chrysanthemum coronarium*

1. Étude botanique et ethnobotanique

Le genre Chrysanthème du grec chrysanthemon qui veut dire fleur d'or (chrysos : or et anthemon : fleur) appartient à la famille des Astéracées et comprend près de 300 espèces. Depuis de nombreux siècles, les plantes de chrysanthème sont utilisées dans la médecine populaire pour traiter la fièvre, l'arthrite, le vertige, les symptômes d'hypertension et les maladies infectieuses telles que la pneumonie, la colite et la stomatite [143].

Chrysanthemum coronarium ou chrysanthème des jardin connu au nom Mourrara, Aasloudya, Rezaïma, Djachouane ou Keraa ed djadja est une plante annuelle largement répandue dans la région méditerranéenne, au Japon, en Chine et aux Philippines [16,119].

Cette plante peut atteindre un mètre de haut (à la floraison). Elle possède une tige fibreuse et robuste, des feuilles disposées en spirale, denses près de la base de la plante, devenant plus espacées à mesure que les tiges s'allongent [144]. Il en existe trois types de *C. coronarium*, classés en fonction de la taille des feuilles : un spécimen avec des feuilles vert foncé étroites et finement divisées, des feuilles de taille intermédiaire, larges, un peu fendues, verte pâle. Le type à feuilles larges est adapté aux régions chaudes, tandis que les types à feuilles intermédiaires et étroites ont une grande capacité d'adaptation au climat, tolérant à la fois le froid et la chaleur. La fleur radiée et solitaire au sommet de la tige est d'une couleur entièrement jaune ou jaune à la base et blanche au contour. Sa période de floraison est entre le printemps et l'automne [145].



Champ de *C. coronarium* (saf-saf, Tlemcen 20-04-2018)



C. coronarium (Plantes de la France : décrites et peintes d'après nature)

Figure 24: illustration *C. coronarium*

Les feuilles et les fleurs de *C. coronarium* sont utilisés sous forme de tisane est comme un diurétique doux qui aide à lutter contre la cystite et la rétention d'eau. En tant qu'herbe tonique, le chrysanthème des jardins est très apprécié en Chine car il est riche en minéraux, en acides aminés et en vitamines A, D et E [146]. Une soupe fine peut être préparée comme tonique de printemps et purificateur du sang et des reins, et pour dissiper un froid persistant et dégager la poitrine des mucosités [147]. Les pétales jaune vif sont utilisés comme un colorant alimentaire. De plus elle est utilisée comme plante ornementale aux bordures des jardins [120].

2. Travaux antérieurs

Plusieurs études ont été munies sur la composition chimique de l'huile essentielle et des extraits de *C. coronarium* ainsi que leur différente activité biologique. L'huile essentielle a montré un effet antiprolifératives *in vitro* sur différentes lignées de cellules cancéreuses humaines, dont le cancer du côlon était le plus sensible [148]. Elle possède aussi un effet anti-inflammatoire comparable à celui du Diclofénac (Anti-inflammatoire non stéroïdien) [149].

L'extrait hydro-alcoolique de *C. coronarium* possède une activité anti-oxydante intéressante due à la présence de deux dérivés de l'acide caféoylquinique [150,151].

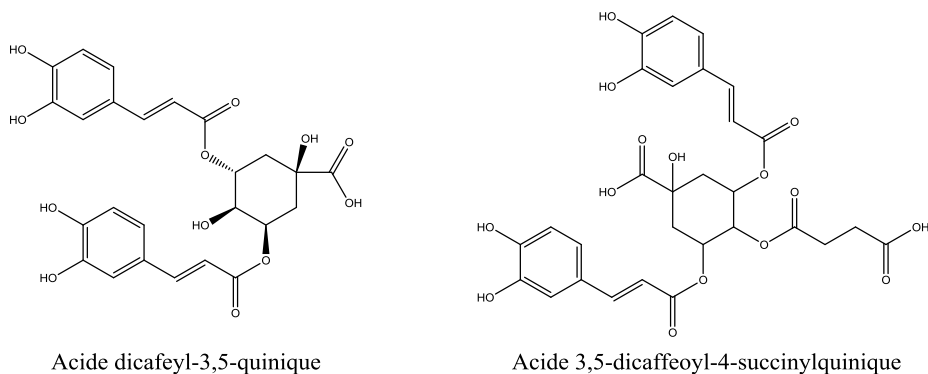


Figure 25: Dérivés de l'acide caféoylquinique présents dans l'extrait de *C. coronarium*

C. coronarium présente d'autres activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne contre *Bacillus cereus* et *staphylococcus aureus*, un effet Antidiabétique et peut lutter contre l'hypercholestérolémie, et des effets phytotoxiques puissant contre les mauvaises herbes [151,152].

3. Rendement et Composition chimique de l'huile essentielle

La récolte a été faite entre la fin avril et début de mois de Mai 2018 à Saf-Saf (Tlemcen). L'huile essentielle d'une couleur bleutée et une odeur narcotique a été obtenue par hydrodistillation de la matière sèche avec un rendement de 0.1%. 54 composés ont été identifiés avec un pourcentage de 91,3% de la composition totale de l'huile. Les composés ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse (EI-MS) et leurs indices de rétention (IR) avec ceux de la bibliothèque spectrale de masse. 25 monoterpènes, 22 sesquiterpènes, 5 composés non-terpéniques et 2 diterpènes ont été identifiés. L'huile essentielle étudiée a été principalement constituée de monoterpènes oxygénés (43.1%), accompagnés de sesquiterpènes hydrocarbonés (21,3% et sesquiterpènes oxygénée (12.5%) (**Tableau 10**).

Les monoterpènes oxygénés ont été représentés principalement par le camphre (12,5%) suivis par le pinacarvone (5.5%), cis-chrysanthényl acétate (4.8%), Lyratyl acétate (3.5%) et trans-chrysanthenyl acétate (3.1%). La deuxième classe dominante de l'huile essentielle été les sesquiterpènes hydrocarbonés avec le farnescène (6.2%), germacrène-D (5.1%) et caryophyllène (3.1%). Les sesquiterpènes oxygénés ont été présents en petites quantités et constituent environ 12.5% de la composition de l'huile et ont été nettement dominés par le caryophyllène oxyde (2,9%), hydrate de epi-cis-sesquisabinène (2,2%) et le bisabolol (2,1%). L'huile essentielle est constituée par un diterpène, le phytol (3,3 %).

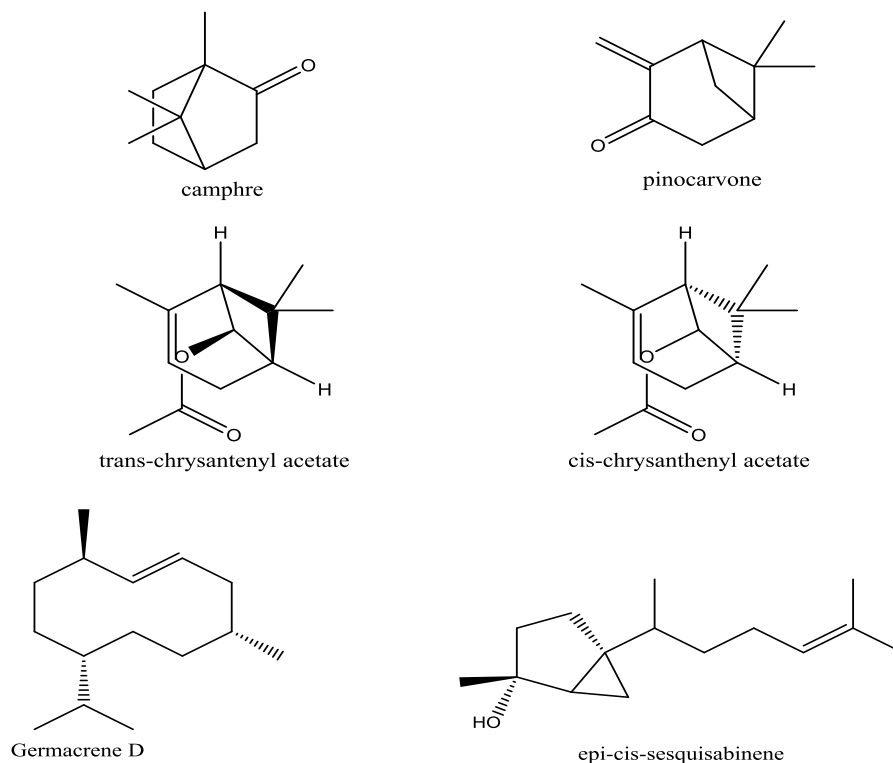


Tableau 10: Composition chimique de l'huile essentielle de *C. coronarium*

N°	Composés	Ira	IRp	%	Identification
1	Pinène	934	1016	0,2	RI, MS
2	Myrcène	982	1153	0,6	RI, MS
3	Yomogi alcool	985	1381	0,4	RI, MS
4	Limonène	1021	1196	0,7	RI, MS
5	Linalool	1081	1545	0,8	RI, MS
6	Camphre	1120	1516	12,5	RI, MS
7	Citronellal	1133	1495	0,2	RI, MS
8	Pinacarvone	1139	1644	5,5	RI, MS
9	Isomenthone	1140	1495	1,9	RI, MS
10	Bornéol	1148	1776	0,9	RI, MS
11	Lyratol	1159	1780	0,2	RI, MS
12	Terpinèn-4-ol	1163	1589	0,2	RI, MS
13	Cymene-8-ol	1169	1833	0,4	RI, MS
14	Terpinéol	1177	1714	0,2	RI, MS
15	Géranyle isovalerate	1202	1663	0,1	RI, MS
16	Pulégone	1212	1620	0,1	RI, MS
17	Trans chrysanthenyl acétate	1240	1699	3,1	RI, MS
18	Cis chrysanthenyl acetate	1247	157	4,8	RI, MS
19	Lyratyl acetate	1259	1630	3,5	RI, MS
20	Bornyl acetate	1264	1572	1,1	RI, MS
21	Lavandulol acetate	1270	1597	0,2	RI, MS
22	Myrtenyl acetate	1326	1729	0,8	RI, MS
23	Verbenone	1358	1604	0,7	RI, MS
24	Caryophyllene	1380	1593	3,1	RI, MS
25	6,8-Nonadien-2-one, 6-methyl-5-(1-methylethylidene)	1404	1750	1,1	RI, MS
26	Bergamotene	1414	1581	0,5	RI, MS
27	Farnescene	1446	1771	6,2	RI, MS

Chapitre III : Résultats et discussions

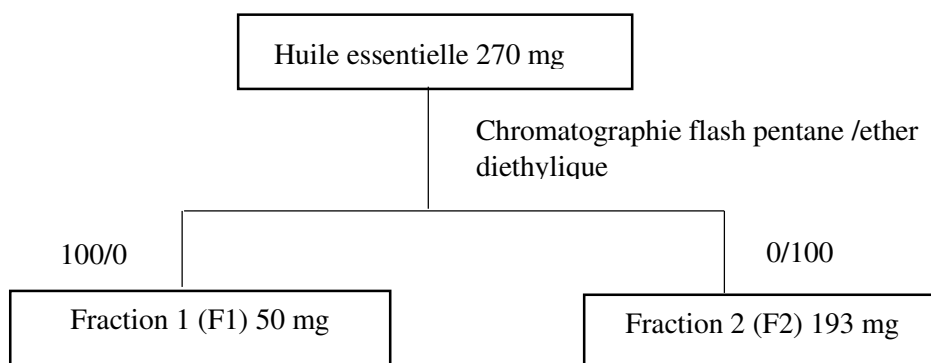
28	Alpha farnesene	1459	1687	1,5	RI, MS
29	Isovalerate de lyratyle	1472	1801	4,4	RI, MS
30	Germacrène-D	1476	1782	5,1	RI, MS
31	Murolène	1490	1740	0,4	RI, MS
32	Beta sesquiphallandrène	1516	1768	3,1	RI, MS
33	Alpha cadinène	1525	1715	0,6	RI, MS
34	(E)- α -Bisabolène	1532	1750	0,4	RI, MS
35	Cis, trans farnésène	1548	1734	0,2	RI, MS
36	Nérolidol	1552	1843	0,3	RI, MS
37	Cis-3-hexenyl benzoate	1559	1971	5,3	RI, MS
38	Spathuléol	1566	2107	1,1	RI, MS
39	Pinocarvéol	1571	1683	0,7	RI, MS
40	Caryophyllène oxyde	1579	1905	2,9	RI, MS
41	Shyobunol	1586	2262	0,2	RI, MS
42	Isoaromadendrène	1590	1616	0,2	RI, MS
43	Viridiflorol	1598	2064	0,8	RI, MS
44	Acoréol	1610	2123	0,3	RI, MS
45	Epi-cis-sesquisabinène hydrate	1622	2156	2,2	RI, MS
46	tau Cadinol	1636	2253	1,3	RI, MS
47	Alpha cadinol	1643	2259	0,6	RI, MS
48	Bisabolol	1670	2218	2,1	RI, MS
49	Geranyl-alpha-terpinène	1957	2218	0,8	RI, MS
50	Linoléate de méthyle	2106	2596	0,3	RI, MS
51	Phytol	2131	2675	2,5	RI, MS
52	Tricosane	2302	2316	0,3	RI, MS
53	Heptacosane	2504	2500	0,5	RI, MS
54	Pentacosane	2500	2500	3,2	RI, MS
Total				91,3	
Monoterpènes hydrocarbonés				1,5	
Monoterpènes oxygénés				43,1	
Sesquiterpènes hydrocarbonés				21,3	
Sesquiterpènes oxygénés				12,5	
Diterpènes				3,3	
Composés non-terpéniques				9,6	

Il est intéressant de noter que la composition chimique de l'huile essentielle de *C. coronarium* est sensiblement susceptible de changer quantitativement et qualitativement en raison du génotype, de l'origine géographique et des facteurs environnementaux. Par exemple, les principaux composants de l'huile essentielle provenant des échantillons de l'Espagne ont été le camphre (29,2%), α -pinène (14,8%), lyratyle l'acétate (9,8%) et β -pinène (8,5%) [153]. D'autre part, la composition en huile essentielle des capitules de *C. coronarium* d'origine tunisienne été la suivante : cis-chrysanthényle acétate (21,82 %), trans-chrysanthényle acétate (12,78 %), (E)- β -farnésène (8,97 %), germacrène-D (8,92 %) et camphre (6,03 %) [151]. Néanmoins, le camphre (17,5%) a été le principal composant de l'huile des capitules de *C. coronarium* de Jordanie, tandis que le santolina triène (4,3%), le néoiso-3-thujanol (5,6%), cis-chrysanthényle acétate (10,8%), l'aldéhyde périllaire (11,7%), l'isoitalicène (4,7%) et le

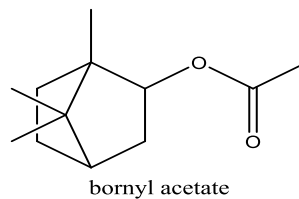
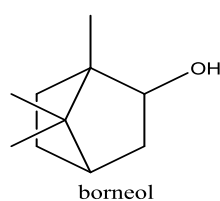
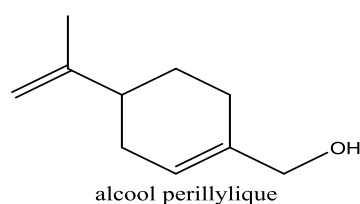
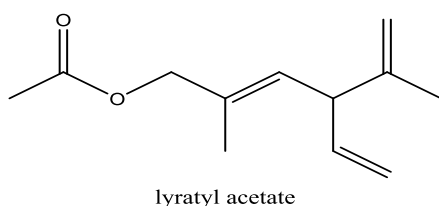
butanoate de phénylpropyle (4,9%) ont été les principaux composants de l'huile essentielle [154].

4. Composition chimique de la fraction polaire de l'huile essentielle de *Chrysanthemum coronarium*

La fraction F1 a été obtenue en utilisant le pentane 100% sur une colonne chromatographique flash. La fraction polaire (F2) a été obtenue par purification sur colonne chromatographique flash avec l'éther d'éthylque 100% sous forme d'une huile verdâtre qui gèle à 25°C.



Le fractionnement de l'huile essentielle a permis de mettre en évidence 11 composés oxygénés supplémentaires identifiés dans la fraction oxygénée et qui n'existait pas dans la composition chimique de l'huile essentielle. Il s'agit de trois alcools monoterpéniques (cis-chrysanthenol, trans-chrysanthenol, et perillyl alcool), un alcool sesquiterpénique (di-epi-1,10-cubanol), deux cétones (artemisia cétone et chrysanthenone), deux aldéhydes (decanal et (E)-2-hexenal), un ester (neryl tiglate) et deux acides carboxyliques (acide hexadécanoïque et l'acide tétradécanoïque).



Chapitre III : Résultats et discussions

La fraction polaire est composée majoritairement par l'alcool périllylique (10,5%), cis-chrysanthenyl acétate (7.8%), lyratyl acétate (7.5%), bornéol (7.1%), bisabolol (6.3%) et bornyl acétate (6.2%) (**Tableau 11**).

Tableau 11: Composition chimique de la fraction polaire de l'huile essentielle de *C. coronarium*

N°	Composés	LIRa	Ira	IRp	%	Identification
1	(E)-2-Hexenal	832	829	1206	2,3	RI, MS
2	Artemisia cétone	1040	1041	1349	5,1	RI, MS
3	Nonanal	1080	1081	1396	0,6	RI, MS
4	Chrysanthenone	1099	1096	1480	0,9	RI, MS
5	Camphre	1120	1125	1513	3,1	RI, MS
6	trans-Chrysanthenol	1132	1130	1268	1,7	RI, MS
7	cis-Chrysanthenol	1146	1146	1253	3,6	RI, MS
8	Borneol	1146	1148	1692	7,1	RI, MS
9	Lyratol	1150	1152	1770	0,9	RI, MS
10	Decanal	1182	1180	1499	0,3	RI, MS
11	Trans chrysanthenyl acetate	1242	1247	1632	3,9	RI, MS
12	Cis chrysanthenyl acetate	1247	1250	1540	7,8	RI, MS
13	Lyratyl acetate	1259	1260	1630	7,5	RI, MS
14	Bornyl acetate	1268	1269	1579	6,3	RI, MS
15	L'alcool périllylique	1274	1275	2006	10,5	RI, MS
16	Myrtenyl acetate	1326	1328	1729	3,6	RI, MS
17	Caryophyllene oxyde	1575	1576	1962	0,6	RI, MS
18	Di-epi-1,10-cubenol	1610	1612	2056	3,6	RI, MS
19	t-Cadinol	1634	1630	2166	3,6	RI, MS
20	α -Cadinol	1644	1645	2229	3,5	RI, MS
21	Neryl tiglate	1652	1650	2055	1,9	RI, MS
22	α -Bisabolol	1677	1675	2214	6,2	RI, MS
23	Acide Tetradecanoïque	1761	1756	2650	1,6	RI, MS
24	Acide Hexadecanoïque	1951	1954	2820	2,8	RI, MS
25	(Z)-Phytol	2080	2085	2611	1,2	RI, MS
26	Acide linoléique méthyl ester	2106	2108	2596	0,9	RI, MS
% Identifications					91,1	
Monoterpènes oxygénés					62	
Sesquiterpènes oxygénés					19,4	
Diterpènes					8,5	
Composés non-terpéniques					1,2	

IV. *Ammoides verticillata*

1. Étude botanique et ethnobotanique

Plusieurs nomenclatures ont été attribuées à cette plante *Ptychotis verticillata*, *Ammoides pusilla* (Breistr), *Psychotis ammoides* (Koch) *Ammoides verticillata* (Briq), *Petroselinus ammoides* (Rchb) *Trachypennuni ammi* (Sprague) [155]. Son nom vernaculaire "Nounkha", connu en arabe sous le nom de Nankhawah, vient de la déformation du nom persan ‘Nan’ et ‘khah’ qui signifie "demander du pain" pour indiquer son action apéritif [119].

2. Travaux antérieurs

A. verticillata est une plante très répandue et importante sur le plan médical. Les racines sont de nature diurétique. Les graines contiennent 2 à 4,4 % d'une huile de couleur brune appelée huile d'ajwain [156]. L'huile de graines ainsi que la plante entière est généralement composé principalement de thymol, mais des variations significatives de la composition chimique de différentes régions ont été observées dans de nombreuses recherches et peuvent être considérées comme des chémotypes comme le thymol, le p-cymène, le carvacrol et le γ -terpinène [156-158].

L'huile essentielle est utilisée dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, du manque d'appétit et des problèmes pulmonaires. De nombreuses propriétés ont été signalées, telles que des effets fongicides, antimicrobiens et antioxydants sur les êtres humains [156].

Le fruit possède des propriétés antispasmodiques et carminatives. C'est un agent correctif important pour les flatulences, la dyspepsie atonique et la diarrhée, et d'autres activités, telles que l'hypotension, l'hépatoprotection [158], antitussif, anticholinergique, anti-inflammatoire, antipaludéen et anthelminthique, l'antispasmodique, le bronchodilatateur et l'expectorant, ont été prouvées [159]. Les graines sont utilisées en petites quantités pour aromatiser de nombreux aliments, comme conservateurs, et pour la fabrication de l'huiles essentielles en parfumerie.

Le travail présenté dans cette partie est une continuité des travaux réalisé par BENYOUCEF.F, (thèse soutenue juin 2020).

3. Rendements et compositions chimiques de l'huile essentielle de *A. verticillata*

Le matériel végétal a été collecté dans les monts de Mafrouche (S1) et Bensekrane (S2). Les huiles essentielles de couleur jaune pâle ont été obtenues à partir des parties aériennes par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger avec respectivement des rendements de 2.8% (m/m).

Tableau 12: Variabilité chimique de l'huile essentielle de *A. verticillata*

No. ^a	Composés	IR _a ^b	IR _a ^c	IR _p ^d	S1	S2	Identification ^e
1	α-Thujène	932	925	1012	-	1.1	RI, MS
2	α-Pinène	931	932	1023	0.8	0.2	RI, MS
3	Sabinène	964	966	1118	0.2	tr	RI, MS
4	Myrcène	976	982	1159	0.7	6.5	RI, MS
5	p-Cymène	1010	1012	1259	19.2	12.5	RI, MS
6	Limonène	1020	1021	1195	19.3	10.4	RI, MS
7	γ-Terpinène	1047	1049	1237	11.1	9.5	RI, MS
8	Terpinene-4-ol	1161	1162	1583	1.1	0.8	RI, MS
9	Thymol	1266	1269	2189	tr	45.3	RI, MS
10	Carvacrol	1282	1278	2220	44.3	8.6	RI, MS
11	α-Humulène	1456	1456	1665	0.1	tr	RI, MS
12	γ-Muuroène	1471	1469	1679	tr	0.2	RI, MS
Identification %					96.8	95.1	
Monoterpènes d'hydrocarbonés					51.3	40.2	
Monoterpènes oxygénés					45.4	54.7	
Sesquiterpènes d'hydrocarbures					0.1	0.2	

Tous les composés ont été identifiés par GC et GC-MS avec ceux de la bibliothèque Arômes. Parmi ces composés, dix monoterpènes et deux sesquiterpènes. Les huiles des deux stations (S1 et S2) ont été dominées par un pourcentage élevé en composés monoterpènes (96.7 % et 94.9%, respectivement) dans lesquels les composés oxygénés (54.7%) pour la station de Bensekrane (S2) ont été plus élevés que les hydrocarbures (40.2 %). Alors que pour la station S1, les composés hydrocarbures (51.3%) sont plus élevés que les oxygénés (45.4 %). Les principaux composants sont le thymol (tr-30,5%), carvacrol (8.6-44.3%), p-cymène (12.5-19.2%), limonène (10.4-19.3%) et γ-terpinène (9.5-11.1%) (**Tableau 12**).

Chapitre IV: Activités biologiques

I. Activité antioxydante

La préservation des produits alimentaires et cosmétiques de manière écologique et efficace a été un axe de recherche important pour l'industrie. Actuellement, les huiles essentielles sont qualifiées d'antioxydants naturels et proposées comme alternatives potentielles aux antioxydants synthétiques. Un certain nombre d'études ont déjà été menées pour prouver que certaines huiles essentielles issues de plantes naturelles peuvent non seulement jouer un rôle clé dans la limitation de l'oxydation des lipides de la viande et d'autres aliments gras en particulier, mais aussi contribuer au développement d'une odeur agréable et d'un goût favorable pour les consommateurs. Dans les compositions cosmétiques contenant des huiles riches en acides gras insaturés, les concepteurs sont obligés d'ajouter des antioxydants et de remplacer les conservateurs synthétiques [160]. L'activité antioxydante des huiles essentielles individuelles, en combinaison, des fractions des huiles essentielles, du composé majoritaire et de ses analogues ont été évalués par le piégeage des radicaux libres (DPPH) et la méthode de la réduction du fer (FRAP) ou par le test de blanchiment du β -carotène

1. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait d'hydrolat, l'huile essentielle de *C. caeruleus*, carlina oxyde et des analogues

L'étude comparative de l'activité du piégeage des radicaux libre DPPH[•] de l'huile essentielle de *C. caeruleus*, de l'extrait d'hydrolat, de l'oxyde de carlina et des analogues avec celle exprimée par le BHT a montré une très bonne activité antioxydante par rapport au composé synthétique BHT. Plus la IC₅₀ est faible, plus le pouvoir antioxydant d'un composé est élevé. Les activités de piégeage des radicaux libres les plus faibles ont été obtenues par l'extrait d'hydrolat (50,3 %) et l'huile essentielle (60,7 %) à une concentration de 50 mL/L, tandis que les activités les plus fortes ont été obtenues par les analogues IM11 (94,26 %), IM2 (91.4%), carlina oxyde (89.6%), IM12 (76.9%) et IM13 (66.5%) à des concentrations de 25 ml/L (**Tableau 13**).

La concentration inhibitrice maximale (IC₅₀) assurant une inhibition de 50 % de la DPPH dans la solution d'essai a été calculée (**Tableau 13**).

L'analogue IM2 a indiqué la plus forte activité dans l'extinction du radical DPPH[•] avec une IC₅₀ de 1.04 mL/L suivi de IM11 (1.9 mL/L), soit environ 15 fois plus élevé que l'antioxydant synthétique utilisé comme référence le BHT (IC₅₀ = 16,4 ml/L ; **Tableau 13**).

Tableau 13: % d'inhibition du DPPH• de HE de *C. caeruleus*, l'extrait d'hydrolat, carlina oxyde, les analogues, et le BHT a différentes concentrations.

Échantillons		Activité anti-oxydante							
BHT	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50			
	I%	18,6±0.8	30,4±1,6	35,9±2,8	55,9±6,3	84,7±9,3			
	IC ₅₀ (mL/L)	16.4							
Huile essentielle	Concentration (mL/L)	0,5	1	2.5	5	10	12.5	25	50
	I%	22.4	21	25.5	30.2	36.1	40.8	50.3	60.7
	IC ₅₀ (mL/L)	24.6							
Hydrolat	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50			
	I%	20.5	35.2	39.3	46.3	50.3			
	IC ₅₀ (mL/L)	46.2							
Car-Ox	Concentration (mL/L)	0.5	1	2.5	5	10	12.5	25	50
	I%	27.7	33.6	46,1	53,6	67,9	76,9	89,6	94,3
	IC ₅₀ (mL/L)	6.2							
IM2	Concentration (mL/L)	1	2.5	5	10	12.5	25		
	I%	49,2	62	65	70,9	72,2	91.4		
	IC ₅₀ (mL/L)	1.04							
IM11	Concentration (mL/L)	1	2.5	5	10	12.5	25		
	I%	30,13	64,9	70.7	81,8	83.6	94.26		
	IC ₅₀ (mL/L)	1.9							
IM12	Concentration (mL/L)	1	2.5	5	10	12.5	25		
	I%	26,8	49.8	52.8	64.4	66.3	76.9		
	IC ₅₀ (mL/L)	3.7							
IM13	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	12.5	25			
	I%	46	51.88	55	56.90	66.5			
	IC ₅₀ (mL/L)	4.97							

La figure 28 représente les valeurs d'absorbance en fonction des différentes concentrations de l'huile essentielle, de l'extrait d'hydrolat et de l'oxyde de Carlina obtenues par la méthode FRAP. On a constaté que l'activité antioxydante des extraits augmente avec la concentration. À des concentrations plus élevées, l'activité antioxydante de l'oxyde de carlina est supérieure à celle de l'huile essentielle, du BHT et de l'extrait d'hydrolat.

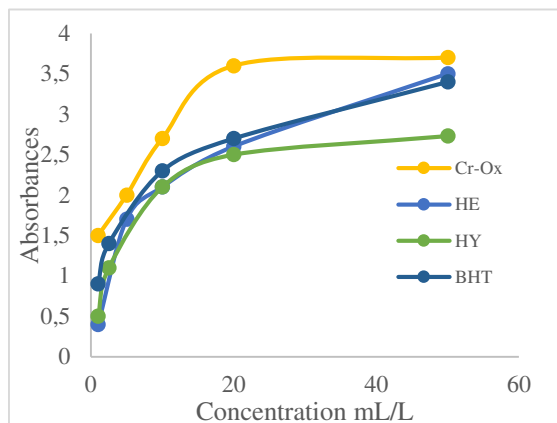


Figure 26: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *C. caeruleus* (HE), de l'extrait d'hydrolat (HY) et de l'oxyde de carlina

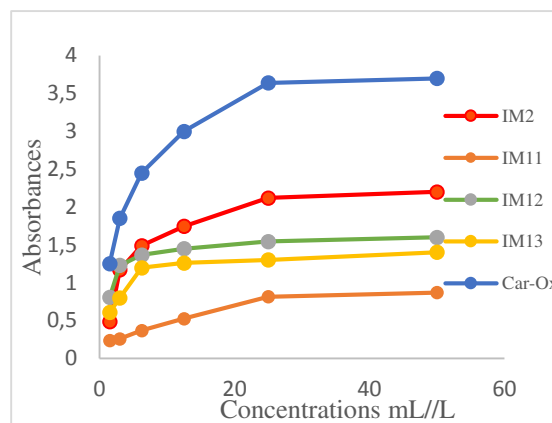


Figure 27: Pouvoir réducteur de carlina oxyde et ses analogues

La figure 28 montre que carlina oxyde possède une meilleure activité antioxydante comparée à ses analogues IM2, IM12, IM13, IM11 respectivement. Cette activité augmente en fonction de la concentration.

En observant les figures 28 et 29 on remarque que les analogues de carlina oxyde ont des valeurs d'absorbance plus faible que celle du BHT, ceci dit ; ce dernier a une meilleure activité comparée aux analogues.

Le test FRAP nous permis de conclure que la meilleur activité antioxydante est attribué au composé naturel carlina oxyde. On remarque qu'il n'y a pas une cohérence entre les résultats des deux méthodes (DPPH et FRAP). Cette différence réside à la spécificité de chacune des méthodes ainsi que la structure des différents composés et leurs mécanismes d'action.

2. Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *A. verticillata* et *C. caeruleus* individuelles et collectives en combinaison

Les concentrations inhibitrices maximales (IC₅₀) des huiles essentielles sont indiquées dans le tableau 14. Dans la présente étude, les deux HE Coll de *A. verticillata* et *C. caeruleus* étudiées ont montré des activités antioxydantes prometteuses par rapport à l'antioxydant synthétique, l'huile essentielle collective de *A. verticillata* a montré la plus forte activité antioxydante lorsqu'elle a été évaluée par les méthodes de blanchiment au β-carotène et de DPPH avec des valeurs d'inhibition des IC₅₀ de 2,3 et 15,2 g/L, respectivement. D'autre part, l'huile essentielle collective de *C. caeruleus* présente une bonne activité antioxydante (IC₅₀ de 4,7 et 26,5 g/L, respectivement) mais qui reste inférieure à l'antioxydant synthétique BHT si l'on en juge par ses valeurs (IC₅₀ de 4,6 et 16,3 g/L, respectivement).

Tableau 14: % d'inhibition du DPPH• et test blanchiment au β-carotène de l'HE de *A. verticillata* et *C. caeruleus* collectif (individuelles et en combinaison)

Tests	IC ₅₀ (g/L)			BHT
	<i>A. verticillata</i>	<i>C. caeruleus</i>	<i>A. verticillata/ C. caeruleus</i>	
	HE Coll		HE Coll	
	Individuelles		1:1 Combinaison	
DPPH	15,2 ± 1,5	26.5 ± 0,9	8.2 ± 0,9	16.3 ± 0,8
Test blanchiment au β-carotène	2,3 ± 0,8	4.7 ± 0,2	0.6 ± 0,6	4,6 ± 0,5

Le mélange des huiles collectives a été très efficace par rapport aux huiles essentielles individuelles par les deux méthodes blanchiment du β-carotène et DPPH qui a montré une augmentation significative de l'activité antioxydante. Les IC₅₀ du mélange de l'huile Coll est de 0,6 et 8,2 g/l, soit environ, respectivement de 7 et 2 fois plus que l'antioxydant synthétique utilisé comme référence, (IC₅₀ = 4,6 g/l et 16,3 g/l (**Tableau 14**)). En général, l'huile Coll de *A. verticillata* et *C. caeruleus* testés individuellement ont montré des activités antioxydantes élevées par rapport à l'antioxydant synthétique.

Dans un mélange binaire, l'interaction entre les deux huiles Coll a montré des effets synergiques significatifs. Ceci s'explique par l'effet synergique résultant des principaux constituants du mélange de *A. verticillata* et *C. caeruleus*, c'est-à-dire entre le thymol (30,5%), le carvacrol (30,5%), le p-cymène (13,1%) et l'oxyde de carlina (95,8%).

3. Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles individuelles (riches en thymol/carvacrol et en oxyde de carlina) et en combinaison

L'activité antioxydante évaluée par les méthodes blanchiment du β-carotène et DPPH de l'huile essentielle de *A. verticillata* de la station S2 (**Tableau 1, Chapitre 2**) contenant du thymol (45,3%) et du p-cymène (12,5%) a montré la plus grande activité antioxydante (IC₅₀ = 5.5 g/l et 32,1 g/l, respectivement) que celle de l'huile essentielle de la station S1 contenant du carvacrol (44,3 %) et du p-cymène (19,2 %) (IC₅₀ = 8,3 g/l et 76,2 g/l, respectivement) mais qui reste inférieure à l'antioxydant synthétique. L'huile essentielle de *C. caeruleus* de la station S2 a indiqué l'activité la plus élevée, avec une IC₅₀ de 2,7 et 6,5 g/l, ce qui est environ deux fois plus élevé que l'antioxydant synthétique utilisé comme référence (**Tableau 15**).

Tableau 15: Activité antioxydante d'huiles essentielles individuelles (riches en thymol et en oxyde de carlina) et en combinaison.

Tests	IC ₅₀ (g/L)			BHT
	<i>A. verticillata</i>	<i>C. caeruleus</i>	<i>A. verticillata/ C. caeruleus</i>	
	(S7)	(S5)	(S7) + (S5)	
	Individual		1:1 Combination	
DPPH	32,1 ± 2,6	6.5 ± 0,9	13.2 ± 0,6	16.3 ± 0,8
test de blanchissement du β-carotène	5,5 ± 0,8	2.7 ± 0,2	2.3 ± 0,1	4,6 ± 0,5

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM

En mélange binaire, les mélanges des huiles essentielles ont été très efficaces par rapport aux huiles essentielles individuelles testées. La combinaison des huiles essentielles de *A. verticillata* et de *C. caeruleus* a montré une augmentation significative de l'activité antioxydante (**Tableaux 15 et 16**). Cependant, il semble que la combinaison de thymol (45,3 %) et de P-cymène (12,5 %) avec l'oxyde de carlina (63,1 %) augmente l'activité antioxydante (IC₅₀ de 2,3 g/l et 13,2 g/l, respectivement) qui est supérieure à l'antioxydant synthétique utilisé comme référence (IC₅₀ = 4,6 g/l et 16,3 g/l, respectivement), testé par le test de blanchissement du β-carotène et DPPH (**Tableau 15**).

En revanche, l'association du carvacrol (44,2 %) et du pcymène (19,2 %) avec l'oxyde de carlina (63,1 %) a été moins efficace avec des IC₅₀ de 18,2 g/l et 4,1 g/l, respectivement, mais qui reste presque égale à l'antioxydant synthétique (**Tableau 16**).

Tableau 16: Activité antioxydante d'huiles essentielles individuelles (riches en carvacrol et en oxyde de carlina) et en combinaison.

Tests	IC ₅₀ (g/L)			BHT
	<i>A. verticillata</i>	<i>C. caeruleus</i>	<i>A. verticillata/ C. caeruleus</i>	
	(S2)	(S5)	(S2) + (S5)	
	Individual		1:1 Combination	
DPPH	76.2 ± 5,5	6.5 ± 0,9	18.2 ± 3,6	16.3 ± 0,8
test de blanchissement du β-carotène	8,3 ± 1,8	2.7 ± 0,2	4.1 ± 2,6	4,6 ± 0,5

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± SEM

Dans la présente étude, il a été observé que l'association des composés phénoliques (thymol, carvacrol et pcymène) avec le composant acétylénique ont présenté un très fort pouvoir

antioxydant, bien supérieur à l'antioxydant synthétique BHT. Tandis que, l'association du carvacrol et du p-cymène avec l'oxyde de carlina avait le même pouvoir antioxydant que le BHT (activité additive). Les huiles essentielles sont des produits végétaux naturels contenant un mélange complexe de composants et ayant donc de multiples propriétés biologiques. La plupart de l'activité antioxydante des huiles essentielles semble dériver de terpénoïdes oxygénés, en particulier les terpènes phénoliques, les phénylpropanoïdes et les alcools. Le thymol, le carvacrol et l'eugénol sont les plus puissants antioxydants présents dans les huiles essentielles examinées, et leurs effets sur l'alimentation font partie de leurs bienfaits pour la santé humaine[31,161].

Plusieurs études ont été menées sur différentes activités biologiques fournies par l'oxyde de carlina qui a montré des activités antimicrobiennes, antitrypanosmiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et antioxydantes très prometteuses [108,124,134,136,162]. Seules quelques études sur l'effet synergique des huiles essentielles ont été documentées. Grosso et al. [163] ont suggéré que la combinaison de thymol, carvacrol et thymoquinone dans l'huile volatile de *Satureja montana* pourrait être responsable de l'augmentation de l'activité antioxydante. Benyoucef et ses collègues [164] ont suggéré que la combinaison des huiles essentielles de *T. fontanesii*, *A. herbaalba* et *R. officinalis* a montré la plus grande activité antioxydante avec une IC₅₀ de 2,6 mg/L presque égale à l'antioxydant synthétique (BHT). L'efficacité antioxydante des huiles essentielles de certaines épices et herbes en combinaison a montré des interactions synergiques.

L'évaluation des différentes combinaisons possibles de ces plantes ont montré que la combinaison coriandre/cumin l'huile de graines a produit des interactions synergiques [73]. Le potentiel antioxydant de ces mélanges augmente les interactions synergiques entre les différents antioxydants et les composés présents dans le mélange d'huiles essentielles. Cependant, on sait très peu de choses sur le mécanisme des interactions qui sont responsables de l'activité antioxydante synergétique [72].

4. Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *A. valentinus*, *C. coronarium*, et leur fractions oxygénées (individuelles et en combinaison) :

Les résultats de l'étude de l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH• des huiles essentielles de *A. valentinus* et de *C. coronarium*, de leurs fractions oxygénées (seuls et en combinaison), et du mélange des huiles essentielles de *A. valentinus* et de *C. coronarium* avec celle obtenue par le composé synthétique BHT a révélé une très bonne activité antioxydante comparé à ce dernier.

Tableau 17: % d'inhibition du DPPH• de HE de *A. valentinus*, *C. coronarium* et leur fractions oxygénées (individuelle et en combinaison)

Échantillons		Activité antioxydante				
BHT	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50
	I%	18,6±0.8	30,4±1,6	35,9±2,8	55,9±6,3	84,7±9,3
	IC ₅₀ (mL/L)	16,4				
HE AV	Concentration (mL/L)	3	6	12.5	25	50
	I%	24,5	41.8	57.9	70.6	76.6
	IC ₅₀ (mL/L)	8,4				
FOXAV	Concentration (mL/L)	3	6	12.5	25	50
	I%	49%	73%	81%	87%	89%
	IC ₅₀ (mL/L)	3,2				
HE CR	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50
	I%	34,76%	59,87%	78,76%	83,91%	89,27%
	IC ₅₀ (mL/L)	4,4				
FOXCR	Concentration (mL/L)	1.5	3	6	12.5	25
	I%	39	50%	82,24%	87,43%	90,44%%
	IC ₅₀ (mL/L)	3				
MEL	Concentration (mL/L)	1.25	2.5	5	10	20
	I%	35.51%	51.6%	73.8%	84.9%	88.4%
	IC ₅₀ (mL/L)	2				
MEL FOX	Concentration (mL/L)	1.5	3	6	12.5	25
	I%	16.7%	33.6%	59.3%	87,43%	91,8%
	IC ₅₀ (mL/L)	4,8				

FOXAV : fraction oxygénée d'*A.valentinus* ; **FOXCR** : fraction oxygénée de *C.coronarium* ;**MEL** :mélange 1 :1 des huiles essentielles *A.valentinus* et *C.coronarium* ; **MEL FOX** : mélange 1 :1 des fractions oxygénées d'*A.valentinus* et *C.coronarium*

La plus faible activité de piégeage des radicaux libres a été obtenue par l'huile de *A. valentinus* (70,6 %) à une concentration de 25 mL/L, tandis que l'activité la plus élevée a été obtenue par la combinaison des fractions oxygénées (91,8 %) suivie par celle de l'huile essentielle de *C. coronarium* (90,44 %) à une concentration de 25 mL/L (**Tableau 17**).

Le mélange (1:1) des huiles essentielles a indiqué la plus forte activité en extinction du radical DPPH• avec une IC₅₀ de 2 mL/L suivi de la fraction oxygénée de l'huile de *C. coronarium*

(3 mL/L), environ 5 fois plus élevée que l'antioxydant synthétique BHT utilisé comme référence ($IC_{50} = 16,4$ mL/L ; (Tableau 17).

L'huile de *A. valentinus* a présenté une IC_{50} de 8,4 mL/L, tandis que l'huile essentielle de *C. coronarium* a été de 4,4 mL/L. Une combinaison de ces deux huiles a montré une IC_{50} de 2 mL/L, on parle donc d'un effet synergique.

La combinaison des fractions oxygénées a montré un effet antagoniste, avec une IC_{50} de la fraction oxygénée de *C. coronarium* de 3 mL/L et de la fraction oxygénée de *A. valentinus* de 3,2 mL/L ; la combinaison a une IC_{50} de 4,8 mL/L.

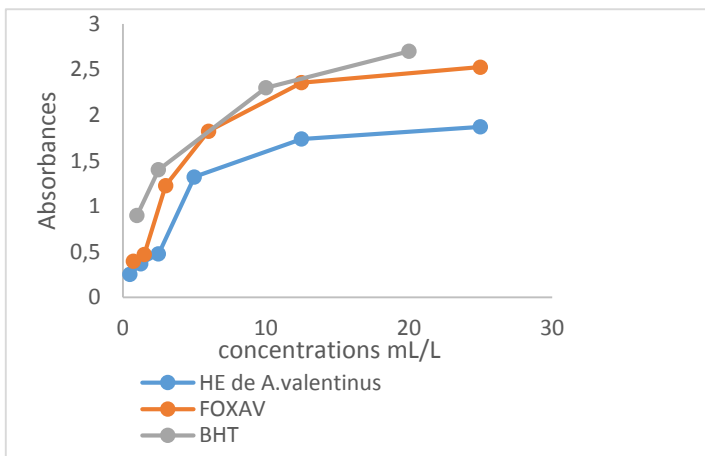


Figure 28: Pouvoir réducteur de l'huile d'*A. valentinus* et sa fraction oxygénée

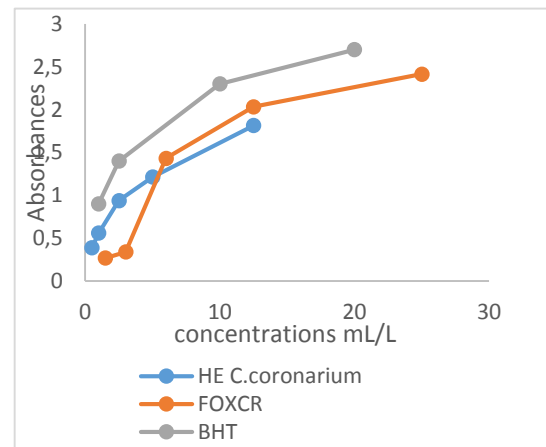


Figure 29: Pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *C. coronarium* et sa fraction oxygénée

La figure 30 montre que l'activité oxydante augmente en fonction de la concentration. L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *A. valentinus* et sa fraction oxygénée est plus faible que celle du BHT. Néanmoins, la fraction oxygénée possède une activité proche du BHT a des concentrations < 20 mL/L (meilleur que celle de l'huile essentielle).

A des concentrations plus faibles, l'huile essentielle de *C. coronarium* a une activité plus intéressante que celle de sa fraction oxygénée, mais qui reste plus faible que celle du BHT (Figure 31).

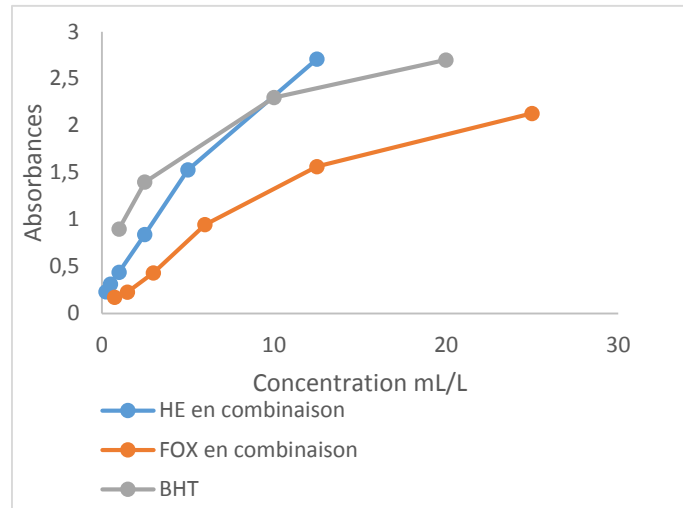


Figure 30: Pouvoir réducteur des huiles en combinaison (1:1) et leurs fractions oxygénées en combinaison (1:1)

La figure 32 montre que le pouvoir réducteur des huiles essentielles en combinaison est plus important que celui des fractions oxygénées en combinaison. À une concentration de 9.5 mL/L le mélange des huiles essentielles (1 :1) possède le même pouvoir que celui du BHT, au-delà de cette concentration l'activité des huiles essentielles en combinaison est plus importante.

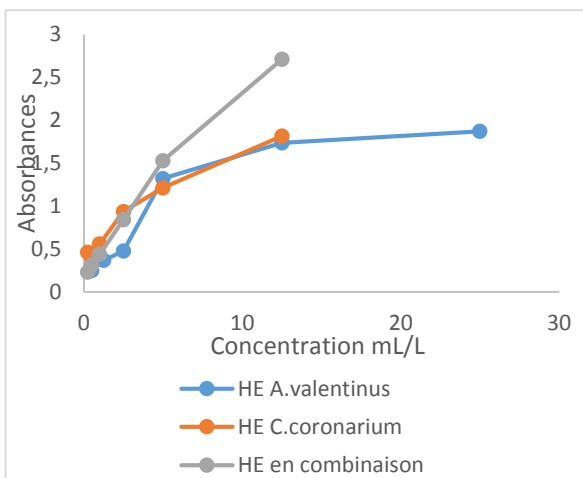


Figure 31: Effet synergique de la combinaison des HES d'*A.valentinus* et *C. coronarium*

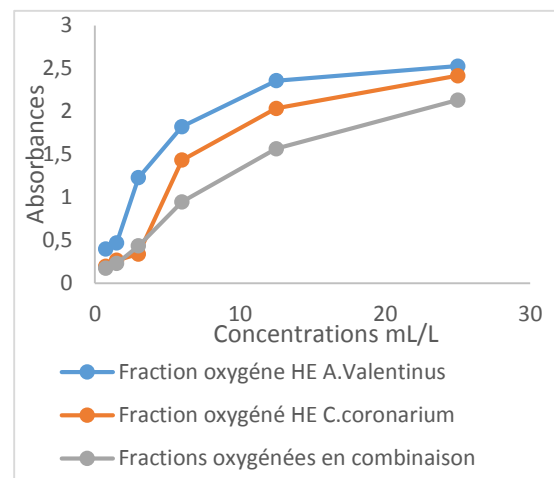


Figure 32: Effet antagoniste des fractions oxygénées en combinaison des HES d'*A.valentinus* et *C. coronarium*

L'huile essentielle de *A. valentinus* et *C. coronarium* possède pratiquement le même pouvoir réducteur. Le mélange 1 :1 de ces deux huiles augmente l'absorbance donc augmente le pouvoir réducteur, dans ce cas on peut dire qu'en mélangeant ces deux huiles avec un ratio de 1 :1 on obtient un effet synergique (**Figure 33**), tandis que pour la combinaison des fractions oxygénées des huiles on obtient un effet antagoniste, cela s'explique par la diminution de

l'absorbance (**Figure 34**). Le test FRAP confirme les résultats de synergisme et antagonisme obtenue par la méthode du DPPH.

II. Activité antifongique

La préoccupation accrue du secteur public concernant le niveau de résidus de pesticides sur les aliments a incité les chercheurs à envisager d'autres solutions que les pesticides de synthèse. Les composés bioactifs naturels provenant des plantes sont généralement considérés comme plus tolérables et moins dangereux que les composés synthétiques pour l'alimentation et la protection des cultures. Les plantes aromatiques et leurs composants bioactifs peuvent jouer un rôle généralement perçu comme des substances sûres pour la protection des cultures et des aliments, ce qui suscite un intérêt accru pour ces plantes [165].

Bien que les huiles essentielles de diverses plantes sauvages se sont avérées efficaces contre un large éventail de micro-organismes *in-vitro*, elles n'ont pas réussi à inhiber la croissance des agents pathogènes *in-vivo* et n'ont pas réussi à contrôler les maladies dans des conditions de terrain dans la plupart des cas. Bien que le criblage *in-vitro* d'extraits de plantes soit une première étape importante dans l'identification des plantes ayant une application potentielle en agriculture, la confirmation *in-vivo* de ce potentiel est essentielle dans la recherche de préparations dérivées de plantes ayant le potentiel d'être commercialisées [166].

1. Tests in vitro de l'huile essentielle, de l'extrait d'hydrolat et de l'oxyde de carlina contre les champignons végétaux.

Les effets de l'extrait d'hydrolat, de l'huile essentielle de *C. caeruleus* et de l'oxyde de Carlina ont été évalués contre les phytopathogènes fongiques : *P. expansum*, *A. niger*, *Trichoderma sp.*, *A. flavus* et *R. oryzae* (**Tableau 18**). Les tests ont montré la variabilité de l'inhibition en fonction des champignons pathogènes testés.

Tableau 18: Activité antifongique in vitro contre les champignons phytopathogènes.

Microorganismes	IC ₅₀ (mg/L)		
	Huile essentielle	Extrait d'hydrolat	Carlina oxyde
<i>P. expansum</i>	20±3.2	> 100	15±2.3
<i>A. niger</i>	77.8±6.8	> 100	56.8±10.7
<i>Trichoderma sp.</i>	20±0.97	> 100	13±0.31
<i>A. flavus</i>	20±2.7	> 100	16±0.78
<i>R. oryzae</i>	> 100	> 100	> 100

Les souches de *P. expansum*, *Trichoderma* sp. et *A. flavus* sont plus sensibles à l'oxyde de Carlina et à l'huile essentielle que celles de *A. niger* et *R. oryzae*. L'approche des concentrations provoquant une inhibition de 50 % (IC₅₀) de la croissance mycélienne a montré que l'oxyde de Carlina et l'huile essentielle ont l'activité la plus forte contre les champignons.

La plus forte activité a été observée par l'oxyde de Carlina contre *Trichoderma* sp., *P. expansum* et *A. flavus* avec des IC₅₀ de 13, 15 et 16 mg/L, alors que *A. niger* (56,8 mg/L) et *A. oryzae* (> 100 mg/L) semblent être des souches moins sensibles.

Les résultats ont indiqué également que l'inhibition de la croissance mycélienne de *Trichoderma* sp., *P. expansum* et *A. flavus* a été significativement influencée par l'huile essentielle avec des valeurs de IC₅₀ de 20 mg/L, respectivement. L'extrait hydrolat de *C. caeruleus* a été le moins actif, les IC₅₀ ont été supérieures à 100 mg/L pour toutes les souches (Tableau 18).

2. Effet de protection in vivo de l'huile essentielle et de l'oxyde de carlina contre l'infection de la pomme causée par *P. expansum*

Étant donné les bons résultats obtenus de l'activité antifongique in vitro, l'activité fongicide in vivo de l'oxyde de Carlina et de l'huile essentielle sur le développement de la maladie de la pomme infectée par *P. expansum* a été testée. L'activité in-vivo a montré que la gravité de la maladie causée par *P. expansum* était significativement réduite ($P \leq 0,05$) par l'oxyde de carlina. Utilisé à la plus faible concentration (0,01 mg/L d'air), l'oxyde de Carlina a montré un effet protecteur très intéressant sur les pommes avec un faible pourcentage d'indice de maladie (33%) jusqu'au 15^{ème} jour de stockage contre la pourriture causée par *P. expansum* (Tableau 19).

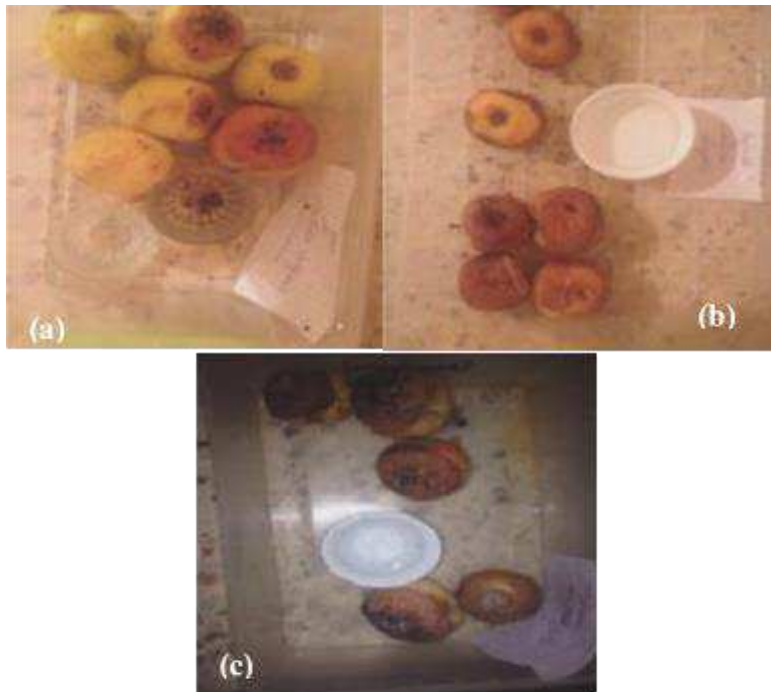
Tableau 19: Effet protecteur de l'huile essentielle et de l'oxyde de carlina contre l'infection des pommes causée par *P. expansum*.

Jour ^a	PDI ^c (%)		
	Contrôle positif ^b	Carlina oxyde (0.01 mg/L air)	Huile essentielle (0.01 mg/L air)
1 ^{er} jour	00	00	00
3 ^{ème} jour	24.7	12.8	16.8
6 ^{ème} jour	50.6	18.9	45.5
9 ^{ème} jour	100	25.8	64.8
15 ^{ème} jour	100	33.2	80.4

(a) Jours de stockage. (b) Contrôle positif. (c) Indice de maladie en pourcentage

Selon la figure 35, le traitement des pommes infectées par *P. expansum* avec l'oxyde de Carlina a eu un effet protecteur significatif sur la réduction de la gravité de la maladie

jusqu'à 15 jours de stockage à 25 °C. L'huile essentielle n'était pas efficace contre la pourriture causée par *P. expansum*, l'indice de maladie en pourcentage était de 80% (**Figure 35a**). Alors que l'indice de maladie en pourcentage était de 100% pour les fruits non traités utilisés comme témoins (**Figure 35c**). L'oxyde de carlina s'est révélé efficace dans les activités antifongiques *in vitro* et *in vivo*. Aucune information sur les propriétés *in-vivo* de cette molécule n'est disponible dans la littérature. Herrmann et al [108] ont étudié l'activité antifongique de l'oxyde de carlina isolé sur *Carlina acaulis* contre *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Ces chercheurs ont montré que l'oxyde de carlina a une forte activité antimicrobienne, même contre les souches multirésistantes et les souches cliniques isolées [134].



(Pommes traitées à l'oxyde de carlina (a), Pommes traitées à l'huile essentielle (b) et témoin positif (sans traitement) (c) sur l'infection causée par *P. expansum* après 15 jours de stockage à 25°C.)

Figure 33: Effet de protection *in vivo* de l'huile essentielle et de l'oxyde de carlina contre l'infection de la pomme causée par *P. expansum*

3. Effet toxique de la fumigation

Les résultats de la toxicité de la fumigation de l'huile essentielle de *C. caeruleus* en plus de l'oxyde de Carlina contre les adultes de *B. oleae* sont résumés dans le tableau 20. L'huile essentielle de *C. caeruleus* s'est montrée très biocide envers les adultes de *B. oleae*, une mortalité de 100% de la population est constatée avec une dose de 50 µl/L d'air après 24 heures d'exposition (**Tableau 20**). Cependant, l'oxyde de Carlina a causé une mortalité supérieure à 70%. La toxicité de la fumigation a mis en évidence le potentiel relatif de l'huile essentielle de

racine et de l'oxyde de carlina comme insecticides naturels contre *B. oleae*. D'un point de vue comparatif, l'huile essentielle produit une meilleure activité insecticide que l'oxyde de carlina. Les propriétés insecticides de l'huile essentielle peuvent être liées à la présence de fortes concentrations d'oxyde de carlina ou à un effet de synergie avec les autres composants de l'huile. De nombreux polyacétylènes ont été trouvés dans des espèces de la famille des Asteraceae et étudiés pour leurs activités insecticides [104], tandis que l'oxyde de carlina n'a pas fait l'objet d'études suffisantes pour ses activités biologiques.

Tableau 20: Effet de fumigation de l'huile essentielle et de l'oxyde de carlina contre *B. oleae* après 24 heures d'exposition.

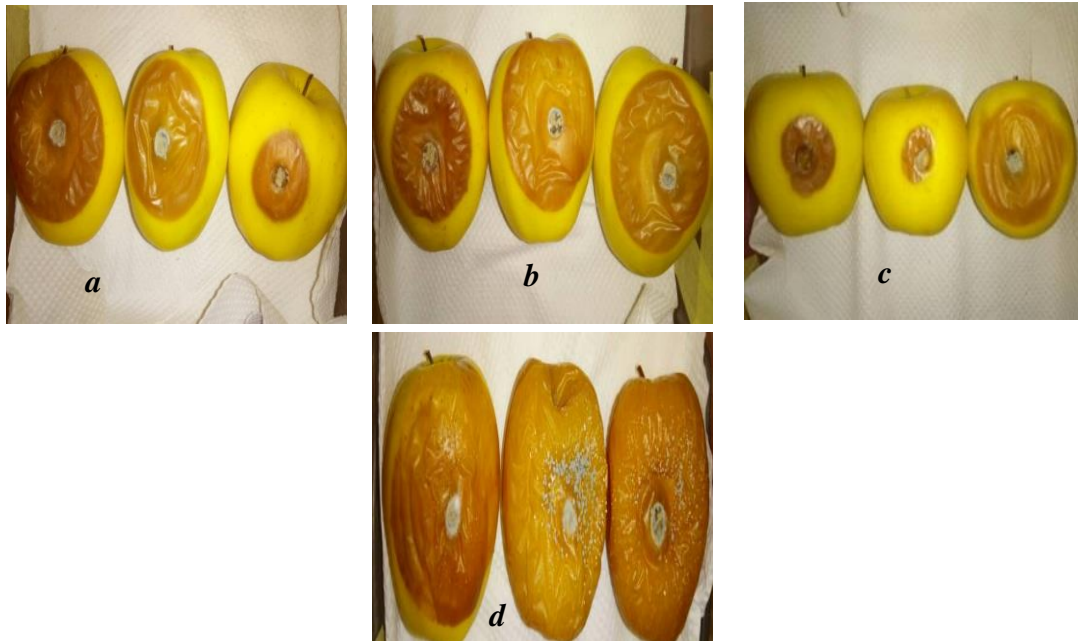
Concentrations ($\mu\text{L/L}$ air)	% de mortalité	
	<i>C. caeruleus</i>	<i>Carlina oxide</i>
20	26.7 \pm 1.2	16.6 \pm 1.2
30	56.8 \pm 5.1	46.6 \pm 2.1
50	100 \pm 00	73.2 \pm 4.3

4. Effet protecteur des huiles essentielle de *A. valentinus* et *C. coronarium* sur les pommes et les poires

Les résultats de la présente étude ont démontré que les huiles essentielles de *A. valentinus* et *C. coronarium* ainsi que leur mélange ont présenté un bon effet contre *P. expansum*, responsable de la décomposition des fruits de la pomme et des poires (**Figure 36 et 37**).

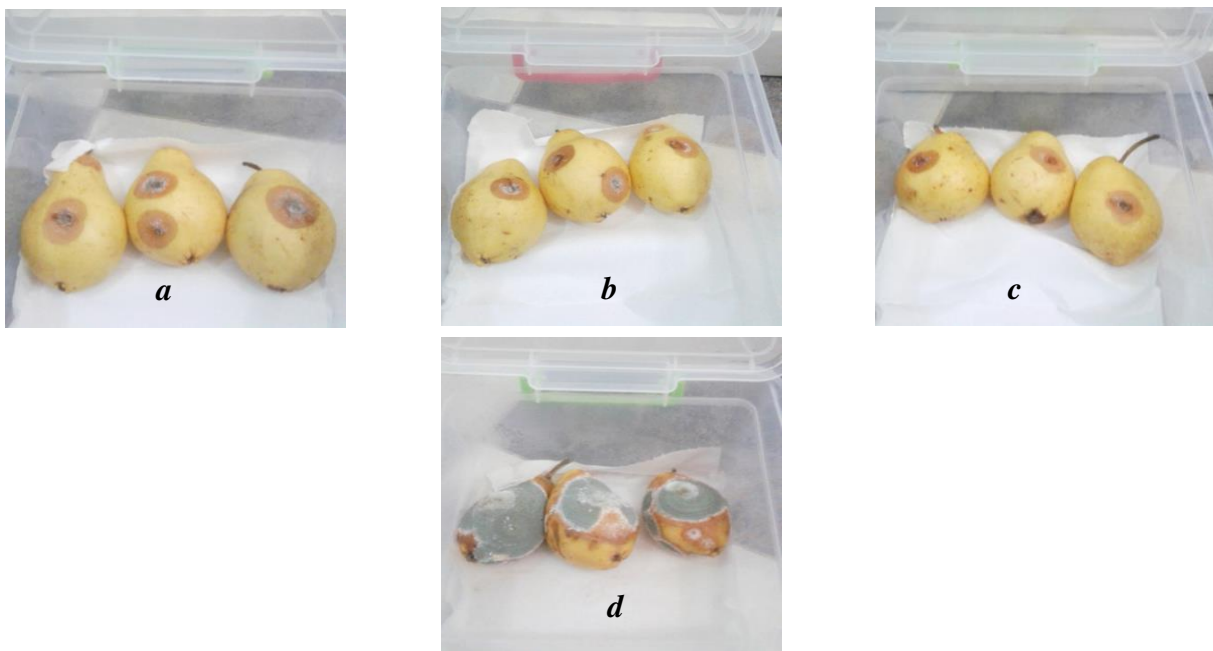
Selon ces observations, nous suggérons que la forte activité antifongique de ces deux huiles pourrait être liée à leurs composants sesquiterpènes et/ou pourrait être liée à la synergie de leurs composants minoritaire et majoritaire (α -bisabolol, linalool et oxyde de caryophyllène) dont les effets antifongiques ont été déjà étudié [167,168].

On remarque aussi qu'il y a un effet synergique entre les deux huiles essentielles, ceci peut être expliqué par la forte concentration des composés responsables de l'activité présents dans le mélange issu des deux huiles essentielles.



a : H.E *A. valentinus* (15 jours), b: HE *C. coronarium* (15 jours), c: mélange de HE de *C. coronarium* et *A. valentinus* (15 jours), d: témoin(15 jours)

Figure 34: Effet protecteur des pomme contre *P. expansum*

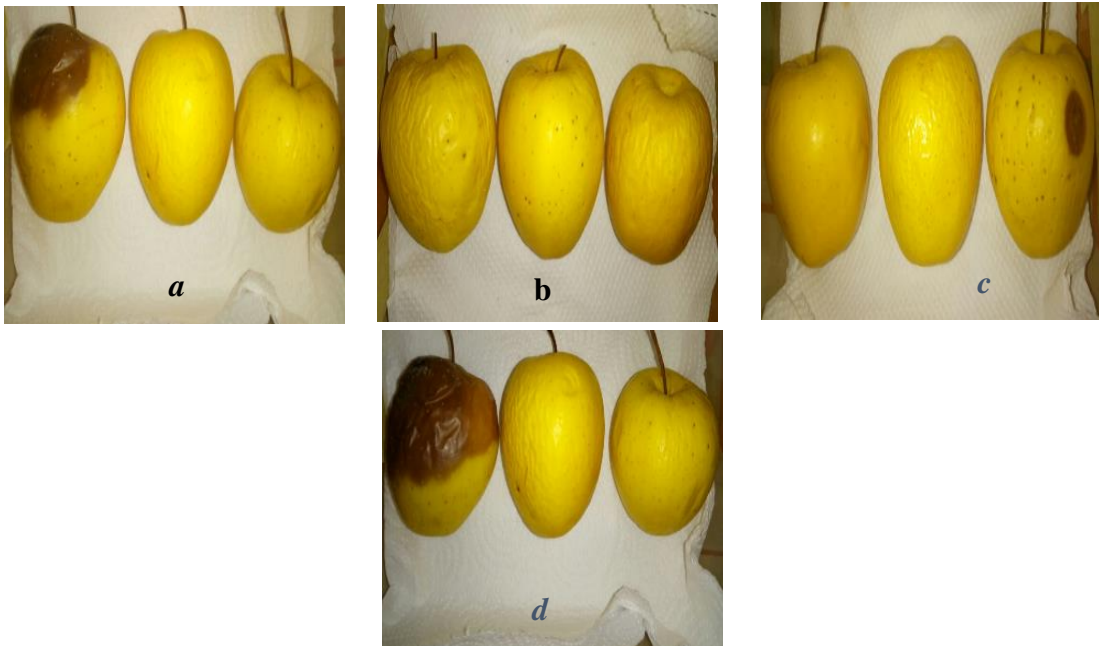


a : H.E *A. valentinus* (10 jours), b: HE *C. coronarium* (9 jours), c: mélange de HE de *C. coronarium* et *A. valentinus* (8 jours), d: témoin (10 jours)

Figure 35: Effet protecteur des poires contre *P. expansum*.

5. Effet préventif des huiles essentielle d'*A. valentinus* et *C. coronarium* sur les pommes et les poires

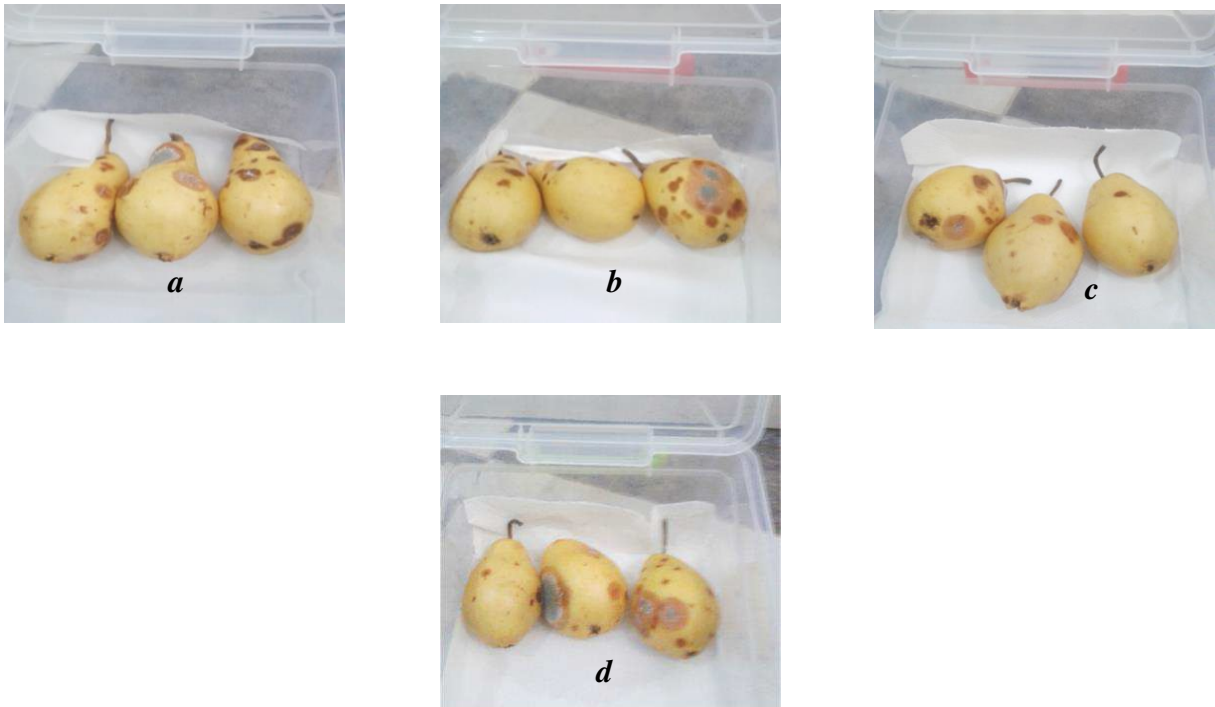
Les huiles essentielles utilisées à la concentration de 0,02 mL/L d'air, ont montré un effet préventif (100%) très intéressant sur les pommes jusqu'aux 60 jours pour *A. valentinus*, 90 jours pour *C. coronarium* et 70 jours pour le mélange des deux huiles contre la pourriture causée par *P. expansum*, par rapport au témoin, qui ont été complètement endommagés dès le dixième jour.



a : H.E *A. valentinus* (70 jours), b: HE *C. coronarium* (90 jours), c: mélange des huiles de *C. coronarium* et *A. valentinus* (70 jours), d: Témoin (10 jours)

Figure 36: Effet préventif des pommes

En ce qui concerne l'effet préventif des huiles sur les poires, pour les mêmes concentrations citées précédemment, les poires sont restées intactes jusqu'au trentième jour lors de leur traitement par l'huile de *A. valentinus* et au quinzième jour par l'huile de *C. coronarium*, alors que le mélange des deux huiles, à partir du troisième jour des taches grise se sont apparues sur l'ensemble des 3 fruits.



a : H.E *A. valentinus* (35 jours), b: HE *C. coronarium* (17 jours), c: mélange des deux huiles de *C. coronarium* et *A. valentinus* (15 jours), d: Témoin (3 jours)

Figure 37: Effet préventif des poires

Selon les résultats obtenus, on peut conclure qu'il est préférable d'utiliser les huiles essentielles de *A. valentinus* et *C. coronarium* séparément, vu que leur utilisation en combinaison n'a aucun effet sur l'amélioration de l'effet préventif.

III. Etude in-silico de l'activité antimicrobienne

Le concept de " serrure et clé " de la liaison protéine-ligand est la meilleure façon pour décrire les interactions. Le récepteur est la "serrure" et le ligand/le chef de file est la "clé". La géométrie interne du récepteur et du ligand est maintenue fixe pendant le docking moléculaire. On trouve alors l'orientation relative correcte de la "clé" qui ouvrira la " serrure ".de ce fait, une fois que le complexe ligand-récepteur est formé, il adaptera la conformation la plus stable, c'est-à-dire le niveau d'énergie le plus bas (**Tableau 21**).

Tableau 21: Bilan énergétique des différents complexes (enzyme-ligand) Kcal/mol

	2UZJ		4M7U		1KZN	
	Score Kcal/mol	Rmsd-refine	Score Kcal/mol	Rmsd-refine	Score Kcal/mol	Rmsd-refine
Ligref	-6.3298	1.5951	-7.9014	2.6476	-8.4386	2.3946
CarOx	-4.8777	1.2085	-4.6940	1.2917	-5.4299	0.9631
IM2	-4.5901	1.4041	-4.6481	1.0088	-5.6445	1.3092
IM3	-4.8714	0.8604	-4.9455	0.5840	-5.4263	1.4554
IM8	-5.9333	2.1819	-5.8233	1.5904	-6.1237	1.8091
IM9	-6.3229	1.6668	-7.4878	2.2864	-6.6749	1.6862
IM10	-6.1176	2.5474	-5.8177	2.4351	-6.0193	1.7480
IM11	-6.2669	1.5162	-7.3378	1.2609	-6.6611	1.6829
IM12	-5.6369	2.2597	-6.6581	2.2953	-6.1715	1.5337
IM13	-5.0363	1.4881	-4.7932	2.1577	-6.2172	1.3251

1. Streptococcal cystéine protéase *mSpeB* mature

Ces résultats montrent que le complexe formé entre le mSpeB et l’analogue IM9 a la plus faible énergie (-6,32288551 Kcal/mol) et qui est plus actif que les complexes formés avec les autres analogues ainsi qu’avec l’oxyde de Carlina (**Tableau 21**)

Pour les complexes *mSpeB*-CarOx, *mSpeB*-IM2, *mSpeB*-IM10, *mSpeB*-IM12 : à l’exception des interactions de Van der Waals (VDW) qui sont perceptibles, les ligands ne présentent aucune autre interaction (**Figure 40**).

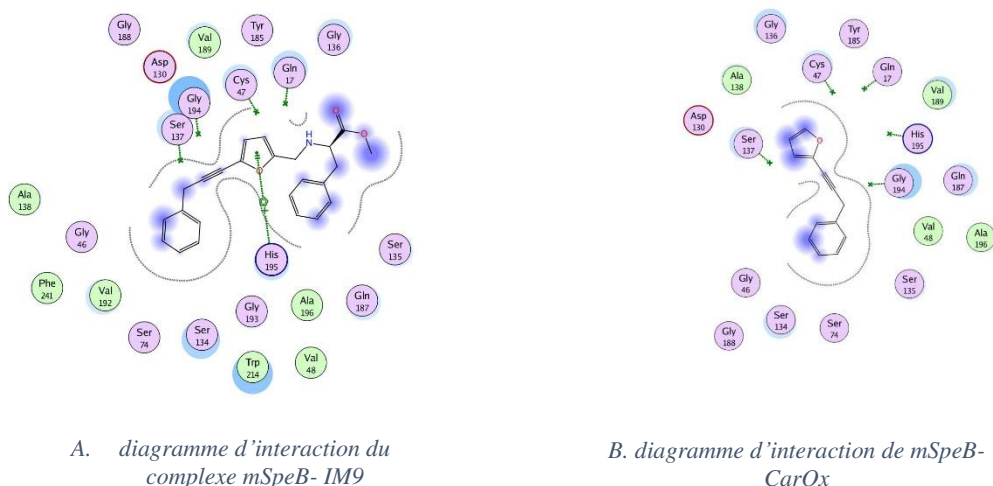


Figure 38: Diagrammes des interactions (*mSpeB*-ligands)

2. Dihydrofolate réductase DHFR d'*Enterococcus faecalis*

Le complexe formé entre le DHFR et l'analogue IM9 a la plus faible énergie (-7,4878 Kcal/mol) et est plus actif que les complexes formés avec les autres analogues ainsi qu'avec l'oxyde de Carlina. Pour les complexes DHFR-CarOx, DHFR- IM9, DHFR- IM10 et DHFR- IM11 : les ligands ne présentent aucune interaction, mais des interactions de Van der Waals (VDW) sont perceptibles.

Le complexe DHFR -IM2 : l'analogue interagit avec l'acide aminé ALA 45 pi-H a une distance de 4.24 Å.

Le complexe DHFR-IM3 : l'analogue interagit avec les acides aminés THR 46, GLY 99 H-accepteur et ALA 45 pi-H à des distances 3.06, 3.21 et 4.54 Å respectivement.

le complexe DHFR -IM13 : l'analogue interagit avec 2 sites différents de l'acide aminé ARG 44 H-accepteur a des distances de 3.16 et 3.50 Å ainsi qu'avec les acides aminés THR 64 et SER 65 H-accepteur a des distances 3.49 et 3.78 Å, respectivement.

Le complexe DHFR- IM8 : l'analogue interagit avec l'acide aminé ARG 44 H-accepteur, 2 sites différents de SER 65 H-accepteur et THR 126 pi-H à une distance de 3,31, 3,13, 2,98 et 4,04 Å respectivement. Pour le complexe DHFR- IM12 : l'analogue interagit avec l'acide aminé ARG 44 H-accepteur et THR 126 pi-H à une distance de 3,00 et 3,97 Å respectivement (**Tableau 21** et **Figure 41**).

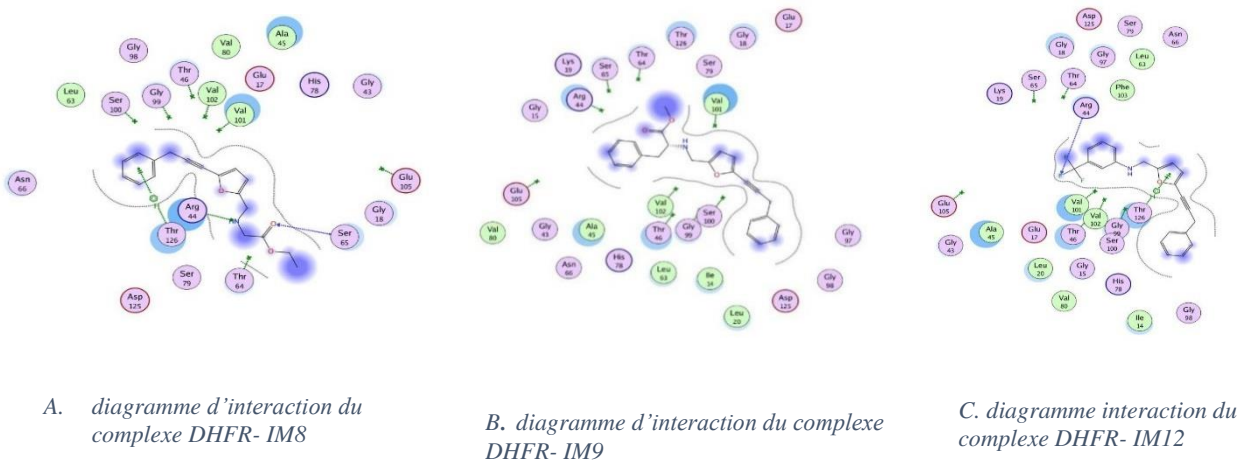


Figure 39: Diagrammes des interactions (DHFR-ligands)

2. ADN gyrase

Selon le tableau 21, le complexe formé entre l'ADN gyrase et l'analogue IM9 a la plus faible énergie (-6,6749 Kcal/mol) et est plus actif que les complexes formés avec les autres analogues ainsi qu'avec l'oxyde de Carlina.

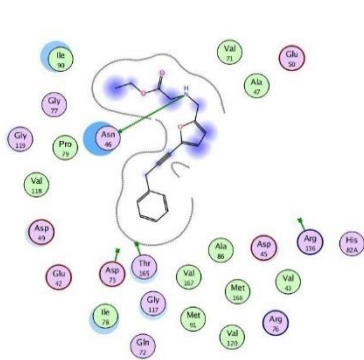
Pour les complexes formés avec l'ADNgyrase - CarOx, IM2, IM9 et IM10, à la seule exception des interactions de Van der Waals (VDW) qui sont perceptibles, les ligands ne présentent aucune autre interaction.

Pour le complexe ADNgyrase-IM3 : l'analogue interagit avec l'acide aminé ASN 46 et PRO79 pi-H à des distances de 4 et 3.86 Å. Respectivement

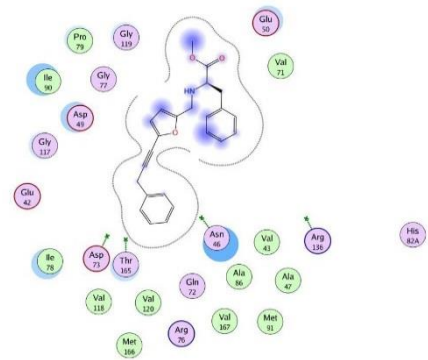
Pour le complexe ADNgyrase-IM8 : l'analogue interagit avec l'acide aminé ASN 46 H-donneur à une distance de 3.28 Å.

Pour le complexe ADN gyrase-IM11 : l'analogue interagit avec l'acide aminé PRO79 pi-H à une distance de 4,05 Å. Pour le complexe ADN gyrase -IM12 : l'analogue interagit avec 2 sites différents de l'acide aminé ARG 76 pi-cation à une distance de 10,97 et 12,93 Å.

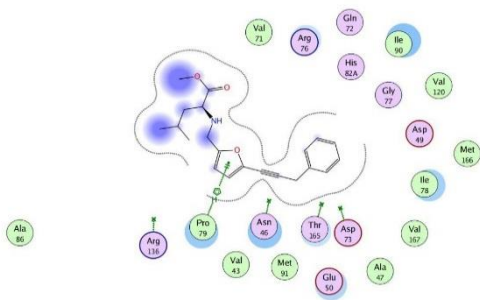
Le complexe ADN gyrase-IM13 : le ligand interagit avec l'acide aminé ARG136 H-accepteur à une distance de 3.49 Å



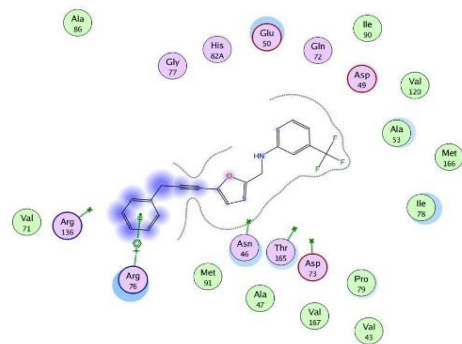
A. Diagramme d'interaction du complexe ADNgyrase-IM8



B. Diagramme d'interaction du complexe ADNgyrase-IM9



C. Diagramme d'interaction du complexe ADNgyrase-IM11



D. Diagramme d'interaction du complexe ADNgyrase-IM12

Figure 40: Diagrammes des interactions (ADNgyrase-ligands)

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Notre travail de recherche s'est basé sur la valorisation des 3 espèces de la famille des astéracées : *C. caeruleus*, *A. valentinus* et *C. coronarium*. L'objectif de notre travail a porté sur l'évaluation des activités antioxydantes, antifongiques et insecticides dans l'espoir de trouver des applications qui permettent de valoriser ces trois espèces.

L'étude menée sur *C. caeruleus* nous a permis de tirer plusieurs informations sur ce genre de plantes. Les résultats ont montré que la plante est une bonne source de dérivés d'acétylène. L'oxyde de Carlina provenant des racines de *C. caeruleus* présentait des propriétés antioxydantes et antifongiques élevés, tandis que l'huile essentielle avait une meilleure activité insecticide. De plus, l'oxyde de carlina a démontré une activité antifongique *in vivo* prometteuse pour contrôler l'infection des pommes contre *P. expansum*. L'extrait d'hydrolat et l'huile essentielle présentaient de faibles activités antioxydantes et antifongiques par rapport à l'oxyde de carlina. Cette baisse d'activité peut être due à l'association de composés non actifs tels que le phytone et l'acide hexadécanoïque. Ces activités prometteuses permettent d'envisager l'utilisation de l'oxyde de carlina comme conservateur alimentaire naturel et fongicide pour améliorer la santé humaine.

D'autre part, nous avons pu introduire quelques modifications à la structure de l'oxyde de Carlina tout en conservant la triple liaison, créant ainsi de nouveaux analogues par des voies chimiques connues. Les structures des nouveaux composés ont été confirmées par différentes méthodes spectroscopiques. L'amarrage moléculaire a également permis de prédire une activité inhibitrice intéressante de trois enzymes d'origine bactérienne de presque tous les analogues, principalement, IM9 par rapport à l'oxyde de Carlina qui est connu pour ses propriétés antibactériennes, et qui permet également de comprendre en détail les diverses interactions entre les ligands et les sites actifs des enzymes, afin d'aider à concevoir de nouveaux inhibiteurs puissants. Dans tous les cas, des études supplémentaires doivent être menées pour la synthèse de carlina oxide et ses analogues afin d'éviter l'épuisement de la nature de ses ressources par la consommation excessive des plantes.

Dans le but de l'étude de l'effet synergique de l'activité antioxydante de *C. caeruleus* en mélange, l'huile essentielle de *A. verticillata* a été choisie grâce à sa richesse en composés à effet thérapeutique intéressant. Les huiles essentielles individuelles de *A. verticillata* et *C. caeruleus* ont démontré des activités antioxydantes intéressantes. En mélange binaire, la combinaison d'huiles essentielles riches en thymol/carvacrol, P-cymène et oxyde de carlina présentait de fortes activités antioxydantes. D'autre part, le mélange des huiles de *A. verticillata*

et de *C. caeruleus* Coll présentait des effets synergiques importants, bien supérieurs à ceux de l'antioxydant synthétique utilisé comme référence (BHT). Cette augmentation de l'activité peut être due à l'association des quatre principaux composés, thymol, carvacrol, p-cymène et l'oxyde de carlina. Ainsi, *A. verticillata* et *C. caeruleus* peuvent être utilisées en combinaison avec des huiles essentielles sources potentielles d'agents antioxydants naturels sûrs et puissants dans les industries pharmaceutiques et alimentaires.

Les huiles essentielles de *A. valentinus* et *C. coronarium* sont composées d'un mélange complexe de composés terpéniques. Contrairement à l'huile essentielle de *C. caeruleus*, ces deux huiles ne possèdent pas de composé majoritaire. De ce fait, on s'est intéressé à étudier en plus à la composition chimique des fractions oxygénées respectivement. Les deux huiles essentielles ont montré un effet préventif et protecteur de l'activité antifongique sur les pommes et les poires. Leur combinaison produit un effet antagoniste pour la prévention contre le champignon. L'huile essentielle de *C. coronarium* a montré une activité antioxydante intéressante contrairement à *A. valentinus*. Le mélange de ses deux huiles augmente l'activité antioxydante contrairement à leur fraction individuelle et en combinaison.

Références

- [1] Gupta VK. Comprehensive bioactive natural products. Texas: Stadium Press; 2010.
- [2] Rostagno MA, Prado JM. Natural Product Extraction: Principles and Applications. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2013.
- [3] Belabbes R. Recherche de nouveaux principes actifs présents dans cinq plantes de la famille des asteraceas. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 2018.
- [4] Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M. Preparative Chromatography Techniques. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998.
- [5] Ikan R. Selected topics in the chemistry of natural products. Singapore ; Hackensack, N.J: World Scientific; 2008.
- [6] Rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. ALGERIE : Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRA); 2006.
- [7] Ilbert H, Hoxha V, Sahi L, Courivaud A, Chailan C. Analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. Montpellier: France AgriMer; 2016.
- [8] Zhang L, Demain AL. Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2005.
- [9] Hong J. Natural Product Synthesis at the Interface of Chemistry and Biology. Chemistry: A European Journal 2014; 20(33):10204–12.
- [10] Newhouse T, Baran PS, Hoffmann RW. The economies of synthesis. Chemical Society Reviews 2009; 38(11): 3010–3021.
- [11] Nicolaou KC, Vourloumis D, Winssinger N, Baran PS. The Art and Science of Total Synthesis at the Dawn of the Twenty-First Century. Angewandte Chemie International Edition 2000: 39(1):44-122.
- [12] Glasenapp-Breiling M, Jagtap PG, Kingston DGI, Montforts F-P, Samala L, Yuan H, et al. The Chemistry of Taxol and Related Taxoids. In: Herz W, Falk H, Kirby GW, editors. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, vol. 84, Vienna: Springer Vienna; 2002: 53–225.
- [13] Kusama H, Hara R, Kawahara S, Nishimori T, Kashima H, Nakamura N, et al. Enantioselective Total Synthesis of (–)-Taxol. Journal of the American Chemical Society 2000; 122:3811–20.
- [14] Rowinsky, MD EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. Annual Review of Medicine 1997; 48:353–74.
- [15] Funk V, Alfonso S, Tod FS, Harold ER. "Classification of Compositae". In: V. Ann Funk, ed., Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy, 2009:171-189.
- [16] Quézel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. vol. 2. Paris : Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique; 1962.
- [17] Filleul, E. *Les Astéracées : description botanique, biologique et étude de plantes médicinales et toxiques*. Thèse d'exercice. Université de Limoges ; 2018.
- [18] Dupont F, Guignard J-L. Botanique: Les familles de plantes. Elsevier Masson; 2011.
- [19] Panero JL, Funk VA. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. Molecular Phylogenetics and Evolution 2008; 47: 757–82.
- [20] Fadil M, Farah A, Haloui T, Rachiq S. Étude ethnobotanique des plantes exploitées par les coopératives et les associations de la région Meknès-Tafilalet au Maroc. Phytothérapie 2015; 13:19-30.
- [21] González-Tejero MR, Casares-Porcel M, Sánchez-Rojas CP, Ramiro-Gutiérrez JM, Molero-Mesa J, Pieroni A, et al. Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. Journal of Ethnopharmacology 2008; 116:341-57.
- [22] Baruah JB. Chemistry of phenolic compounds: state of the art. New York: Nova Science Publishers; 2011.

- [23] Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T. Thin layer chromatography in phytochemistry. Boca Raton: CRC Press; 2008.
- [24] Talapatra SK, Talapatra B. Chemistry of Plant Natural Products. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
- [25] Çitoğlu G, Acikara Ö. Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids. In: S. Dhanarasu, ed., *Chromatography and Its Applications*. Rijeka, Croatia : IntechOpen ; 2012:13-50.
- [26] Breitmaier E. Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Weinheim, Germany : Wiley-VCH; 2006.
- [27] Kumar R, Tripathi YC. Getting Fragrance from Plants. In: Training Manual on Extraction Technology of Natural Dyes & Aroma Therapy and Cultivation Value Addition of Medicinal Plants, 1st ed. Dehradun (India): Forest Research Institute ; 2011:77-102.
- [28] Thoppil RJ. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology* 2011 ; 3(9): 228–249.
- [29] Tomko AM, Whynot EG, Ellis LD, Dupré DJ. Anti-Cancer Potential of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids Present in Cannabis. *Cancers* 2020 ; 12(7):1985.
- [30] Ramawat K. and Mérillon J. Natural Products. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.
- [31] Preedy V. Essential oils in food preservation, flavor and safety. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2016.
- [32] Guenther E. The essential oils: history, origin in plants, production: Volume I. New York: D. Van Nostrand Company; 1948.
- [33] Jugreet BS, Suroowan S, Rengasamy RRR, Mahomoodally MF. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends in Food Science & Technology* 2020; 101:89–105.
- [34] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 2008; 46:446–75.
- [35] Barbieri C, Borsotto P. Essential Oils: Market and Legislation. In: El-Shemy HA, editor. *Potential of Essential Oils*, InTech; 2018.
- [36] Bessah R. La filière des huiles essentielles. *Revue des Energies Renouvelables* 2015; 18 (3): 513-528
- [37] Masotti V, Juteau F, Bessière JM, Viano J. Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molinieri* and Its Biological Activities. *J Agric Food Chem* 2003; 51:7115–21.
- [38] Turek C, Stintzing FC. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. *Food Research International* 2012; 46:341–53.
- [39] Turek C, Stintzing FC. Stability of Essential Oils: A Review: Stability of essential oils.... *Comprehensive reviews in food science and food safety* 2013; 12:40–53.
- [40] Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014; 2014:1–14.
- [41] Başer KHC, Buchbauer G, editors. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
- [42] Odak I, Lukic T, Talic S. Impact of Storage Conditions on Alteration of Juniper and Immortelle Essential Oils. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2018; 21:614–22.
- [43] Mahadagde MrP. Techniques Available for the Extraction of Essential Oils from Plants: A Review. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology* 2018; 6:2931–5.
- [44] Clevenger JF. Apparatus for the Determination of Volatile Oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association (1912)* 1928; 17:345–9.
- [45] Catty S. *Hydrosols: the next aromatherapy*. Rochester, Vt: Healing Arts Press; 2001.
- [46] Sherma J, Fried B, editors. *Practical thin-layer chromatography: a multidisciplinary approach*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1996.

- [47] Trovati G, Sanches EA, Chierice GO. TLC Separation and Identification of the Essential Oil Constituents from *Aloysia gratissima*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2009; 32:890–5.
- [48] K. Tuley de Silva. *A Manual on the Essential Oil Industry*. United Nations Industrial Development Organization. 1995.
- [49] Svendsen AB, Scheffer JJC, editors. *Essential Oils and Aromatic Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1985.
- [50] Kirchner JG, Miller JM. Preparation of terpeneless essential oils. a chromatographic process. *Ind Eng Chem* 1952; 44:318–21.
- [51] Jennings W. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. Elsevier; 1980.
- [52] Sköld M, Karlberg A-T, Matura M, Börje A. The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44:538–45.
- [53] Khayyat SA, Roselin LS. Recent progress in photochemical reaction on main components of some essential oils. *Journal of Saudi Chemical Society* 2018; 22:855–75.
- [54] Angelini P, Tirillini B, Akhtar MS, Dimitriu L, Bricchi E, Bertuzzi G, et al. Essential Oil with Anticancer Activity: An Overview. In: Akhtar MS, Swamy MK, editors. *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements*, Singapore: Springer Singapore; 2018, p 207–31.
- [55] Elshafie HS, Camele I. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. *BioMed Research International* 2017; 2017:1–14.
- [56] Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL, Cabral C, Pires IM. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018; 2018:1–12.
- [57] Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore G, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules* 2017; 22:70.
- [58] Pavithra PS, Mehta A, Verma RS. Induction of apoptosis by essential oil from *P. missionis* in skin epidermoid cancer cells. *Phytomedicine* 2018; 50:184–95.
- [59] Cha J-D, Kim Y-H, Kim J-Y. Essential oil and 1,8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. *Food Science Biotechnology* 2010; 19:185–91.
- [60] Jayaprakasha GK, Murthy KNC, Uckoo RM, Patil BS. Chemical composition of volatile oil from *Citrus limettoides* and their inhibition of colon cancer cell proliferation. *Industrial Crops and Products* 2013; 45:200–7.
- [61] Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, et al. Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2012; 360:51–60.
- [62] Deb DD, Parimala G, Saravana Devi S, Chakraborty T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chemico-Biological Interactions* 2011; 193:97–106.
- [63] Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research* 2000; 49:619–26.
- [64] de Cássia da Silveira e Sá R, Lima T, da Nóbrega F, de Brito A, de Sousa D. Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(12): 2392.
- [65] Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging: Chitosan film properties with rosemary essential oil. *International Journal of Food Science & Technology* 2012;47: 847–53.
- [66] Walentowska J, Foksowicz-Flaczyk J. Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013; 84:407–11.

- [67] Rhind J. Essential oils: a handbook for aromatherapy practice. London; Philadelphia: Singing Dragon; 2012.
- [68] Malcolm BJ, Tallian K. Essential oil of lavender in anxiety disorders: Ready for prime time? *Mental Health Clinician* 2017; 7:147–55.
- [69] Sánchez-Vidaña DI, Ngai SP-C, He W, Chow JK-W, Lau BW-M, Tsang HW-H. The Effectiveness of Aromatherapy for Depressive Symptoms: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017; 2017:1–21.
- [70] Ali B, Al-Wabel N, Shams S, Ahamad A, Khan S, and Anwar F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015; 5(8): 601-611.
- [71] Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines* 2016; 3(4):25.
- [72] Sonam KS, Guleria S. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. *annals of pharmacology and pharmaceutics* 2017;2(8): 1086.
- [73] Bag A, Chattopadhyay RR. Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. *PLOS ONE* 2015; 10:e0131321.
- [74] Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical Reviews in Microbiology* 2014; 40:76–94.
- [75] Hashemi SMB, Khaneghah AM. Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications; Wiley-Blackwell ;2017.
- [76] Brereton RG. Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant. Chichester, West Sussex, England; Hoboken, Wiley; 2010.
- [77] Cserhádi T. Multivariate methods in chromatography: a practical guide. Chichester, England ; Hoboken, Wiley; 2008.
- [78] Rajput P, Sharma A. Synthesis and biological importance of amide analogues. *Journal of Pharmacology and Medicinal Chemistry* 2018; 2(1):22-31.
- [79] Montalbetti, C. and Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005; 61(46):0827-10852.
- [80] Katritzky AR, Scriven EFV, Majumder S, Akhmedova RG, Akhmedov NG, Vakulenko AV. Direct nitration of five membered heterocycles. *Arkivoc*, 2005;(3):179-191.
- [81] Považanec F. Furan derivatives. 1C. Role of acetic anhydride in nitration of 3-(2-furyl)acrylic acid. *Chemicke Zvesti* 1978;32 (2): 267-27.
- [82] Minkin VI, Dorofeenko GN. Formylation and acylation of organic compounds with substituted amides of carboxylic acids. *Russian Chemical Reviews* 1960; 29:599–618.
- [83] Vilsmeier A, Haack A. Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer *p*-Alkylamino-benzaldehyde. *Chemische Berichte* 1927; 60:119–22.
- [84] Giles, Paul R., Marson, CM. Synthesis using Vilsmeier reagents. CRC Press. 1994.
- [85] Isac-García J, Dobado JA, Calvo-Flores FG, Martínez-García H. Green Chemistry Experiments. *Experimental Organic Chemistry*, Elsevier; 2016, p. 417–84.
- [86] Abdel-Magid AF, Carson KG, Harris BD, Maryanoff CA, Shah RD. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. *Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures*. *The Journal of Organic Chemistry* 1996; 61:3849–62.
- [87] Gribble GW, Nutaitis CF. Sodium borohydride in carboxylic acid media. a review of the synthetic utility of acyloxyborohydrides. *Organic Preparations and Procedures International* 1985; 17:317–84.
- [88] Borch RF, Bernstein MD, Durst HD. Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *Journal of the American Chemical Society* 1971; 93:2897–904.
- [89] Laue, T., Plagens, A. and Vogel, C. Named organic reactions. Chichester, England: Wiley , 2005.
- [90] Pawar HS, Wagh AS, Lali AM. Triethylamine: a potential N-base surrogate for pyridine in Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes and malonic acid. *New Journal of Chemistry* 2016; 40:4962–8.

- [91] van Schijndel J, Canalle LA, Molendijk D, Meuldijk J. The green Knoevenagel condensation: solvent-free condensation of benzaldehydes. *Green Chemistry Letters and Reviews* 2017; 10:404–11.
- [92] Kaupp G, Reza Naimi-Jamal M, Schmeyers J. Solvent-free Knoevenagel condensations and Michael additions in the solid state and in the melt with quantitative yield. *Tetrahedron* 2003; 59:3753–60.
- [93] Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1998;62:1201–4.
- [94] Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 2013; 85:957–98.
- [95] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 1995; 28:25–30.
- [96] Ahmad R, Baharum S, Bunawan H, Lee M, Mohd Noor N, Rohani E, et al. Volatile Profiling of Aromatic Traditional Medicinal Plant, *Polygonum minus* in Different Tissues and Its Biological Activities. *Molecules* 2014; 19:19220–42.
- [97] Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 1986; 44(6):307-315.
- [98] Gupta D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2015;6.
- [99] Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry* 2009; 114:1198–205.
- [100] Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4. ed., 4. printing. St. Paul, Minn: APS Press; 2006.
- [101] Samson, R. A, Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. *Introduction to food- and airborne fungi*. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS); 2001.
- [102] Singh P, Srivastava B, Kumar A, Kumar R, Dubey NK, Gupta R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008; 88:2421–5.
- [103] Pandey, D, Tripathi, N, Tripathi, R. Fungi-toxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 1982; 89:344–349.
- [104] Tian J, Zeng X, Lü A, Zhu A, Peng X, Wang Y. Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes. *LWT - Food Science and Technology* 2015; 60:63–70.
- [105] Abbott WS. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology* 1925; 18:265–7.
- [106] Nwuche CO, Ujam OT, Ibezim A, Ujam IB. Experimental and *In-Silico* Investigation of Anti-Microbial Activity of 1-Chloro-2-Isocyanatoethane Derivatives of Thiomorpholine, Piperazine and Morpholine. *PLOS ONE* 2017; 12:e0170150.
- [107] Garrett-Mayer E, editor. *Principles of Anticancer Drug Development*. New York, NY: Springer New York; 2011.
- [108] Herrmann F, Hamoud R, Sporer F, Tahrani A, Wink M. Carlina Oxide – A Natural Polyacetylene from *Carlina acaulis* (Asteraceae) with Potent Antitrypanosomal and Antimicrobial Properties. *Planta Medica* 2011; 77:1905–11.
- [109] Olsen JG, Dagil R, Niclasen LM, Sørensen OE, Kragelund BB. Structure of the Mature Streptococcal Cysteine Protease Exotoxin mSpeB in Its Active Dimeric Form. *Journal of Molecular Biology* 2009; 393:693–703.
- [110] Berggren, K., Johansson, B., Fex, T., Kihlberg, J., Björck, L. and Luthman, K., 2009. Synthesis and biological evaluation of reversible inhibitors of IdeS, a bacterial cysteine protease and virulence determinant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009, 17(9):3463-3470.

- [111] Tsai P-J, Kuo C-F, Lin K-Y, Lin Y-S, Lei H-Y, Chen F-F, et al. Effect of Group A Streptococcal Cysteine Protease on Invasion of Epithelial Cells. *American Society for Microbiology* 1998; 66:1460–6.
- [112] Moon A, Khan D, Gajbhiye P, Jariya M. *In silico* Docking of Various Inhibitors of *E. Faecalis* Folate Pathway. *International Journal of Scientific and Research Publications* 2017;7:13.
- [113] Bourne CR, Wakeham N, Webb N, Nammalwar B, Bunce RA, Berlin KD, et al. The Structure and Competitive Substrate Inhibition of Dihydrofolate Reductase from *Enterococcus faecalis* Reveal Restrictions to Cofactor Docking. *Biochemistry* 2014; 53:1228–38.
- [114] Oefner C, Bandera M, Haldimann A, Laue H, Schulz H, Mukhija S, et al. Increased hydrophobic interactions of iclaprim with *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase are responsible for the increase in affinity and antibacterial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 63:687–98.
- [115] Peters, T. *Bioactive conformation II*. Berlin : Springer; 2008.
- [116] Donnenberg MS. *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Academic Press; 2002.
- [117] Perdih A, Renko M, Anderluh G, Solmajer T. Structure-Based Discovery of Substituted 4,5-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 14.
- [118] Molecular Operating Environment (MOE). Canada: Chemical Computing GroupInc; 2013.
- [119] Trabut L. Répertoire des noms indigènes des plantes dans le nord de l’Afrique. Ibis Press. Alger: 1935.
- [120] Wells L Jane. *The Ladies’ Flower-garden of Ornamental Perennials*; London; 1841.
- [121] Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH. *Flora Europaea Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*. Cambridge: Cambridge University Press; 1976; 4.
- [122] Amina B, Fethia F. Ethnobotanical study, phytochemical characterization and healing effect of *Carthamus caeruleus* L. rhizomes. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2013; 3:61-68.
- [123] Đorđević S, Petrović S, Dobrić S, Milenković M, Vučićević D, Žižić S, et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109:458–63.
- [124] Mejdoub K, Mami IR, Belabbes R, Dib MEA, Djabou N, Tabti B, et al. Chemical Variability of *Atractylis gummifera* Essential Oils at Three Developmental Stages and Investigation of Their Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities. *Current Bioactive Compounds* 2020; 16:489–97.
- [125] Gottlieb D, Shaw PD. *Biosynthesis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg; 1967.
- [126] Stojanović-Radić Z, Čomić L, Radulović N, Blagojević P, Mihajilov-Krstev T, Rajković J. Commercial *Carlinae radix* herbal drug: Botanical identity, chemical composition and antimicrobial properties. *Pharmaceutical Biology* 2012;50:933–40.
- [127] Benelli G, Pavela R, Petrelli R, Nzekoue FK, Cappellacci L, Lupidi G, et al. *Carlina* oxide from *Carlina acaulis* root essential oil acts as a potent mosquito larvicide. *Industrial Crops and Products* 2019; 137:356–66.
- [128] Schmidt B, Audörsch S. Stereoselective Total Syntheses of Polyacetylene Plant Metabolites via Ester-Tethered Ring Closing Metathesis. *The Journal of Organic Chemistry* 2017;82:1743–60.
- [129] Semmler FW. Zusammensetzung des ätherischen Oels der Eberwurzel (*Carlina acaulis* L.). *Chemische Berichte* 1906; 39:726–31.
- [130] Gilman H, Van Ess PR, Burtner RR. The Constitution of *Carlina*-oxide. *Journal of the American Chemical Society* 1933; 55:3461–3.
- [131] Parry EJ. *The chemistry of essential oils and artificial perfumes*. London: Scott, Greenwood and Son 1921.
- [132] Pfau ASt, Pictet J, Plattner Pl, Susz B. Etudes sur les matières végétales volatiles III. Constitution et synthèse du Carlinoxyde. *Helvetica Chimica Acta* 1935;18:935–51. .
- [133] Atkinson RE, Curtis RF, Taylor JA. Naturally-occurring thiophens. Part III. Synthesis of thienyl- and furyl-acetylene derivatives from cuprous acetylides. *Journal of the Chemical Society, C* 1967:578.

- [134] Đorđević S, Petrović S, Dobrić S, Milenković M, Vučićević D, Žižić S, et al. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109:458–63.
- [135] Link P, Roth K, Sporer F, Wink M. *Carlina acaulis* Exhibits Antioxidant Activity and Counteracts A β Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules* 2016; 21:871.
- [136] Belabbes R, Mami IR, Dib MEA, Mejdoub K, Tabti B, Costa J, et al. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Echinops spinosus* and *Carlina vulgaris* Rich in Polyacetylene Compounds. *Current Nutrition & Food Science* 2020; 16:563–70.
- [137] Rai M, editor. *Medicinal plants: biodiversity and drugs*. Boca Raton: CRC Press; 2012.
- [138] Humphries CJ. A revision of the genus *Anacyclus* L. (Compositae : Anthemideae) 1979.
- [139] Lamarck J-B. *Flore française, ou Descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France*. Paris : Desray; 1815.
- [140] Larbi KS, Meddah B, Meddah ATT, Sonnet P. The antibacterial effect of two medicinal plants *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus* (asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 2016;8(2):244.
- [141] Greger H. Comparative phytochemistry and systematics of *Anacyclus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 1978; 6:11–7.
- [142] Houicher A. Chemical composition and antifungal activity of *Anacyclus valentinus* essential oil from Algeria. *Food Bioscience* 2018, 25:28-31.
- [143] Tadjeddine AL, Kambouche N, Medjdoub H, Dicko A, Saidi S, Derdour A. Antidiabetic effect of *Anacyclus valentinus* L. aqueous extract in normoglycemic and streptozotocin induced-diabetic rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 2013; 5:424-431.
- [144] Seidenberg C. *The New Orleans garden*. Jackson: University Press of Mississippi; 1993.
- [145] Rubatzky VE, Yamaguchi M. *World Vegetables: Principles, Production, and Nutritive Values*. Boston, MA: Springer US; 1997.
- [146] Staples G, Kristiansen MS. *Ethnic culinary herbs: a guide to identification and cultivation in Hawaii*. Honolulu: University of Hawaii Press; 1999.
- [147] Roberts M. *100 edible & healing flowers: cultivating, cooking, restoring health*. 2014.
- [148] Lim TK. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 7, Flowers*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014.
- [149] Bardaweel SK, Hudaib MM, Tawaha KA, Bashatwah RM. Studies on the In Vitro Antiproliferative, Antimicrobial, Antioxidant, and Acetylcholinesterase Inhibition Activities Associated with *Chrysanthemum coronarium* Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015; 2015:1–6.
- [150] Boutaghane N, Kabouche A, El-Azzouny AM, Kabouche Z. Composition of the essential oil of *Chrysanthemum macrocarpum* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* 2008; 44:817–8.
- [151] Chuda Y, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Nagata T, Tsushida T. Structural Identification of Two Antioxidant Quinic Acid Derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996, 44(8): 2037-2039.
- [152] Hosni K, Hassen I, Sebei H, Casabianca H. Secondary metabolites from *Chrysanthemum coronarium* (Garland) flowerheads: Chemical composition and biological activities. *Industrial Crops and Products* 2013; 44:263–71.
- [153] Abd-Alla HI, Albalawy MA, Aly HF, Shalaby NMM, Shaker KH. Flavone Composition and Antihypercholesterolemic and Antihyperglycemic Activities of *Chrysanthemum coronarium* L. *Zeitschrift Für Naturforschung C* 2014; 69:199–208. .
- [154] Alvarez-Castellanos PP, Bishop CD, Pascual-Villalobos MJ. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry* 2001; 57:99–102.
- [155] Tawaha K, Hudaib M. Volatile oil profiles of the aerial parts of Jordanian garland, *Chrysanthemum coronarium*. *Pharmaceutical Biology* 2010; 48:1108–14.

- [156] El Ouariachi EM, Tomi P, Bouyanzer A, Hammouti B, Desjobert J-M, Costa J, et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49:533–6.
- [157] Attou A, Davenne D, Benmansour A, Lazouni HA. Chemical composition and biological activities of *Ammoides verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytothérapie* 2019, 17(1): 2-8.
- [158] Balbaa S, Hilal S, Haggag M. The volatile oil from the herb and fruits of *carum copticum* at different stages of growth. *Planta Medica* 1973; 23:312–20.
- [159] Ahsan SK, Shah AH, Ahmad MS, Tariq M, Ageel AM. Studies on some herbal drugs used against kidney stones in Saudi folk medicine. *Fitoterapia* 1990; 61:435–8.
- [160] Bairwa R, Rajawat B, Sodha R. *Trachyspermum ammi*. *Phcog Rev* 2012; 6:56.
- [161] Li Y, Fabiano-Tixier A-S, Chemat F. *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Cham: Springer International Publishing; 2014.
- [162] Elgndi MA, Filip S, Pavlič B, Vladić J, Stanojković T, Žižak Ž, et al. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* 2017; 128:128–37.
- [163] Mami IR, Belabbes R, Amine Dib ME, Tabti B, Costa J, Muselli A. Biological Activities of Carlina Oxide Isolated from the Roots of *Carthamus caeruleus*. *Natural Product Journal* 2020; 10:145–52.
- [164] Grosso C, Oliveira AC, Mainar AM, Urieta JS, Barroso JG, Palavra AMF. Antioxidant Activities of the Supercritical and Conventional *Satureja montana* Extracts. *Journal of Food Science* 2009; 74:C713–7.
- [165] Benyoucef F, Dib MEA, Arrar Z, Costa J, Muselli A. Synergistic Antioxidant Activity and Chemical Composition of Essential Oils From *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* and *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Applied Biotechnology Reports* 2018; 5:151–6.
- [166] Razzaghi-Abyaneh M, Rai M, editors. *Antifungal Metabolites from Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
- [167] Hadizadeh I, Peivastegan B, Hamzehzarghani H. Antifungal Activity of Essential Oils from Some Medicinal Plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences*, 6(5), 857-861. 2009:5.
- [168] Yang D, Michel L, Chaumont JP, Millet-Clerc J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of *onychomycosis*. *Mycopathologia* 1999;148:79–82.
- [169] D’Auria FD, Tecca M, Strippoli V, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Medical Mycology* 2005;43:391–6..

Productions scientifiques

Publications

- **Mami IR**, Amina TZ, Pérard J, Arrar Z, Dib MEA. Hemisyntheses and In-Silico Study of New Analogues of Carlina Oxide from *Carthamus Caeruleus* Roots. CCHTS 2020.
- **Mami IR**, Merad-Boussalah N, El Amine Dib M, Tabti B, Costa J, Muselli A. « Chemical variability and antioxidant activities of the essential oils of the aerial parts of *Ammoides verticillata* and the roots of *Carthamus caeruleus* and their synergistic effect in combination ». CCHTS, 2020
- **Mami I.R**, Belabbes R, Amine Dib ME, Tabti B, Costa J, Muselli A. « Biological Activities of Carlina Oxide Isolated from the Roots of *Carthamus caeruleus* ». NPJ 2019
- Belabbes R, **Mami IR**, Dib MEA, Mejdoub K, Tabti B, Costa J, et al. « Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Echinops spinosus* and *Carlina vulgaris* Rich in Polyacetylene Compounds ». CNF 2019
- Mejdoub K, **Mami IR**, Belabbes R, Dib MEA, Djabou N, Tabti B, et al. « Chemical Variability of *Atractylis gummifera* Essential Oils at Three Developmental Stages and Investigation of Their Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities ». CBC ,2018
- Zatla AT, **Mami I**, Dib MEA, Sifi MEA. « Efficacy of Essential Oil and Hydrosol Extract of *Marrubium vulgare* on Fungi Responsible for Apples Rot ». AIA, 2020.

Communications

- AT. Zatla, **I. Mami**, M.A. Dib. « Étude de l'activité anti-fongique de l'huile essentielle de *Chrysanthemum Coronarium* de l'Ouest Algerien » *conférence internationale : Management de l'Environnement, des Ressources Naturelles et de la Santé*. 24-26 Juin, **2020**, Errachidia, **Maroc**.
- **I. Mami**, M.A. Dib, AT. Zatla, J. Perard « Hemisynthesis of analogues of carlina oxide and their antioxidant activity » *4èmes Journées Internationales de Chimie Organique d'Annaba*, 1- 3 Décembre, **2018**, Annaba, **Algerie**.
- **I.Mami**, R. Belabbes, N. Merad, A. Medbouhi, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou, M.A. Dib. « Composition chimique et activité antifongique de l'huile essentielle des racines de *Carthamus caeruleus* d'Algérie » *3 ème Salon National des PPAM (AROMED)*, 4-6 octobre, **2016**, Alger, **Algérie**
- N. Merad, A. Medbouhi, M. Bendahou, **I. Mami**, J. Costa, A. Muselli, M.A. Dib, N. Djabou. « Composition chimique et activité biologiques de l'huile essentielle d'*Eryngium*

triquetrum de l'ouest algérien » 3^{ème} Salon National des PPAM (AROMED), 4-6 octobre, **2016**, Alger, **Algérie**

- R. Belabbes, F. Zahra Benomari, A. Medbouhi, **I. Mami**, N. Merad, A. Muselli, J. Costa, N. Djabou, M.A. Dib « Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat de *Calendula arvensis* (Viall.) d'Algérie » 3^{ème} Salon National des PPAM (AROMED), 4-6 octobre, **2016**, Alger, **Algérie**

- AT. Zatla, **I. Mami**, Sb. Alam A. Medbouhi M.A. Dib, N. Djabou A. Muselli, J. Costa, « Chemical composition, Seasonal variations, Antifungal and Larvicidal activities of essential oils of *Marrubium vulgare*, growing wild of West-Algeria ». *International Symposium on Essential Oils; ISEO*. 11-14 septembre, **2016**, Nice, **France**,

- R. Belabbes **I. Mami**, F.Z. Benomari, M.A. Dib, N. Djabou, A. Muselli, J. Costa « Chemical composition and biological activities of Essential oil and hydrosol extract of *Calendula arvensis* (vaill.) from Algeria » ». *International Symposium on Essential Oils; ISEO*. 11-14 septembre, **2016**, Nice, **France**,

RESEARCH ARTICLE

Hemisyntheses and *In-Silico* Study of New Analogues of Carlina Oxide from *Carthamus Caeruleus* Roots

Imane Rihab Mami¹, Tabet Zatla Amina¹, Joëlle Pérard², Zoheir Arrar¹ and Mohammed El Amine Dib^{3,*}

¹Laboratoire de chimie organique, substances naturelles et analyses (COSNA), Université de Tlemcen, Algérie;

²Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, CNRS (UMR 8038); ³Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie)

Abstract: Aim and Objective: Nowadays, developing effective antibiotics for bacterial control has become difficult due to increased resistance to the available medicines in the market. Essential oils possess interesting biological properties as some of their components have very powerful antiviral and antibacterial properties. *Carthamus caeruleus* is a plant that has antibacterial and antioxidant activity due to the presence of an acetylenic compound, Carlina oxide. The aim of this work was to provide, for the first time, the chemical modifications to the structure of Carlina oxide and the *in-silico* study of these analogues.

ARTICLE HISTORY

Received: August 03, 2020
Revised: October 04, 2020
Accepted: October 06, 2020

DOI:
[10.2174/1386207323999201103214141](https://doi.org/10.2174/1386207323999201103214141)

Materials and Methods: The essential oil of *Carthamus caeruleus* was extracted by steam distillation in a Clevenger-type apparatus. Carlina oxide component was separated by column chromatography. Five new analogues were synthesized and identified by spectroscopic analyses (RMN, IR and SM). Molecular docking simulation study was performed using Molecular Operating Environment software (MOE) on three enzymes of bacterial origin (*Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus faecalis*).

Results: Five new compounds derived from Carlina oxide were synthesized (IM8-IM12), and their structures were characterized by infrared (IR), ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR). The new synthesized compounds were evaluated as mSpeB, DHFR from *Enterococcus faecalis* and DNA gyrase inhibitors by a docking analysis using MOE. These results show interesting ligand interactions with the three enzymes, and the best result was attributed to the complexes formed with IM9, which had the lowest score.

Conclusion: In fact, these new compounds could lead to powerful approaches for the research and development of new antibiotics.

Keywords: Carlina oxide, vilsmeier -haack reaction, reductive amination. molecular docking, *Enterococcus faecalis*, DNA gyrase inhibitors.

1. INTRODUCTION

Over time, the massive and repeated use of antibiotics creates various forms of increased bacterial resistance that threaten the effectiveness of treatments. Therefore, many infections are becoming increasingly difficult to treat, such as pneumonia, gonorrhea, tuberculosis and even salmonellosis, and are one of the major causes of the increased mortality of the global population [1]. The success of plant-based products, such as paclitaxol in the treatment of tumors or artemisinin in the treatment of malaria, has

given the impetus for the introduction of numerous research projects, particularly in the pharmaceutical industry [2-4]. Considerable efforts are being made to generate new molecules of natural origin (plant, marine, microbial, etc.) [5].

Formerly, polyacetylenes were not the kind of compounds that were expected to be found in nature because of their instability and the lack of means of their identification, and according to Semmler *et al.* [6], it was very unlikely to find a natural acetylenic product but with time and the evolution of identification techniques, these compounds have been the focus of several researches [7]. Acetylene includes all substances with a triple carbon-carbon bond or alkynyl functional groups, which are chemically and biologically active. Due to their high reactivity, they can be

*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail a_dibdz@yahoo.com.

degraded or oxidized under certain conditions, such as UV light or pH of the medium, which characterizes them as an unstable product, necessitating particular extraction and investigation conditions [8]. These compounds may contain heteroatoms, such as oxygen, sulphur and nitrogen; it includes aliphatic and various cyclic structures [9,10]. Acetylenes are widespread in nature as they are found in living materials and form distinguishable groups of chemically and biologically active natural compounds, which have been detected in numerous higher plant families. More than 1100 different acetylenes have been extracted and identified in species of the Asteraceae family [11-14].

Carlina oxide is an acetylenic compound that was isolated for the first time from *Carlina accaulis* by Semmler *et al.* [6] in 1906, and its correct structure was proposed by Gilman *et al.* [15] in 1933. Subsequently, it has been confirmed that Carlina oxide is present in the chemical composition of several extracts and essential oils of plants belonging to the Asteraceae family; it is present mainly in the essential oils of *Carlina accaulis* [14-16], *Carlina acanthifolia* [17], *Carlina diae* [18], *Carlina vulgaris* [19], *Atractylis gummifera* [20] and *Carthamus caeruleus* [21], which gives them potential biological effects.

Several studies have been conducted on different biological activities provided by this compound, which has shown very promising antimicrobial, antitrypanosomal, anti-inflammatory, antiulcer, and antioxidant activities [19-24]. On the other hand, the study by Benelli *et al.* [25] showed that Carlina oxide exhibits certain non-selective cytotoxicity towards normal human dermis cells and tumor cell lines. The toxicity of Carlina oxide is partly due to the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase [26,27]. *Carthamus caeruleus* is a plant that is traditionally used as a healing agent, and helps to heal burns and treat skin diseases [27]. It is also used against joint inflammations and is very effective against diseases like syndrome colon irritable for cancer patients. In a previous study, it was shown that the essential oil of the roots of *Carthamus caeruleus* was rich in Carlina oxide with a percentage exceeding 80% [21].

To our knowledge, no work has reported the synthesis of the analogues of Carlina oxide and the study of their biological activities. The main objective of this work consisted of preparing five new analogues of Carlina oxide by hemisynthesis and studying their in-silico antimicrobial activity against *Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus faecalis*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. General Information

All chemical reagents and solvents used in this study were purchased from commercial sources (Aldrich and Fluka) as reagents of certified quality and used without any further purification. The infrared spectra were monitored on Agilent technologies cary 600 series FTIR. ¹H NMR experiments were performed in deuterated chloroform (CDCl₃). Compounds spectra were recorded on a Bruker Avance 300 MHz using the TMS as an internal standard. The chemical shifts were referenced to the residual solvent signal and expressed in ppm. All compounds were regularly checked by TLC and ¹H NMR. The TLC was performed on Fluka F₂₅₄ silica gel and

visualized under light at 254 nm or by the revelation of phosphomolybdic acid. Silica gel (60Å, 70-230 mesh, 63-200 µm Fluka) was used for column chromatography. After the extractions and reactions, the solvent was removed using a rotary evaporator under reduced pressure.

2.2. Plant Material, Extraction of Essential Oil, and Isolation of Carlina Oxide

Roots of *Carthamus caeruleus* were harvested from Beni Snous station near Tlemcen city (Algeria) in May 2017. The essential oil of air-dried roots of *Carthamus caeruleus* was extracted by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus, according to the European Pharmacopoeia. Carlina oxide was isolated using silica gel column chromatography (FC, silica gel 200-500 mm) eluted by hexane/EtOAc (3:1).

2.3. General Procedure for the Formylation of Carlina Oxide (IM2)

Method 1: 0.85 ml of freshly distilled POCl₃ was added dropwise to 0.8 ml of anhydrous DMF at 0 °C. The mixture was left for 20 min under external cooling. Carlina oxide (8.23 mmol) was added slowly. The mixture was stirred for 45 minutes at 90 °C and cooled on ice. The resulting mixture was neutralized with 60% K₂CO₃. The organic phase was extracted 3 times with chloroform and dried under MgSO₄. After vacuum elimination of the solvent, the residue obtained in a black paste-like was purified by chromatographic column on silica gel with a mixture of cyclohexane-diethyl ether (80:20).

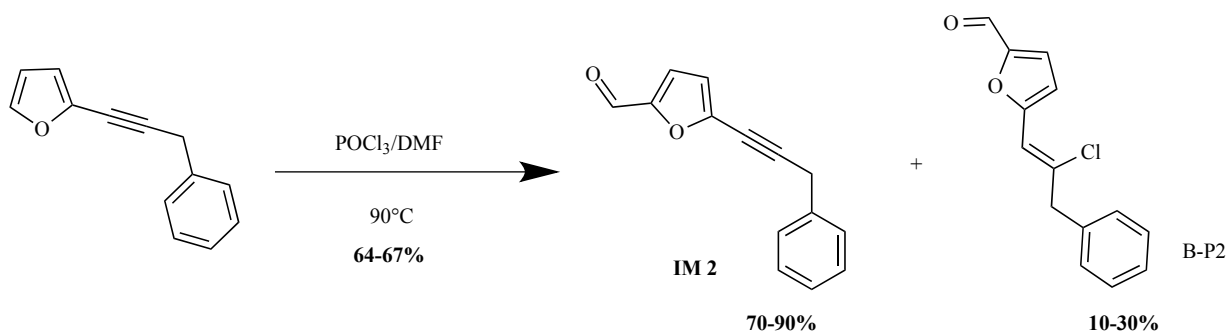
Method 2: In order to remove the HCl produced during the formylation reaction, a gas trap was employed and a few drops of triethylamine were added to the reaction mixtures under the same conditions as in Method 1.

2.4. General procedure for the preparation of IM8, IM10, IM11

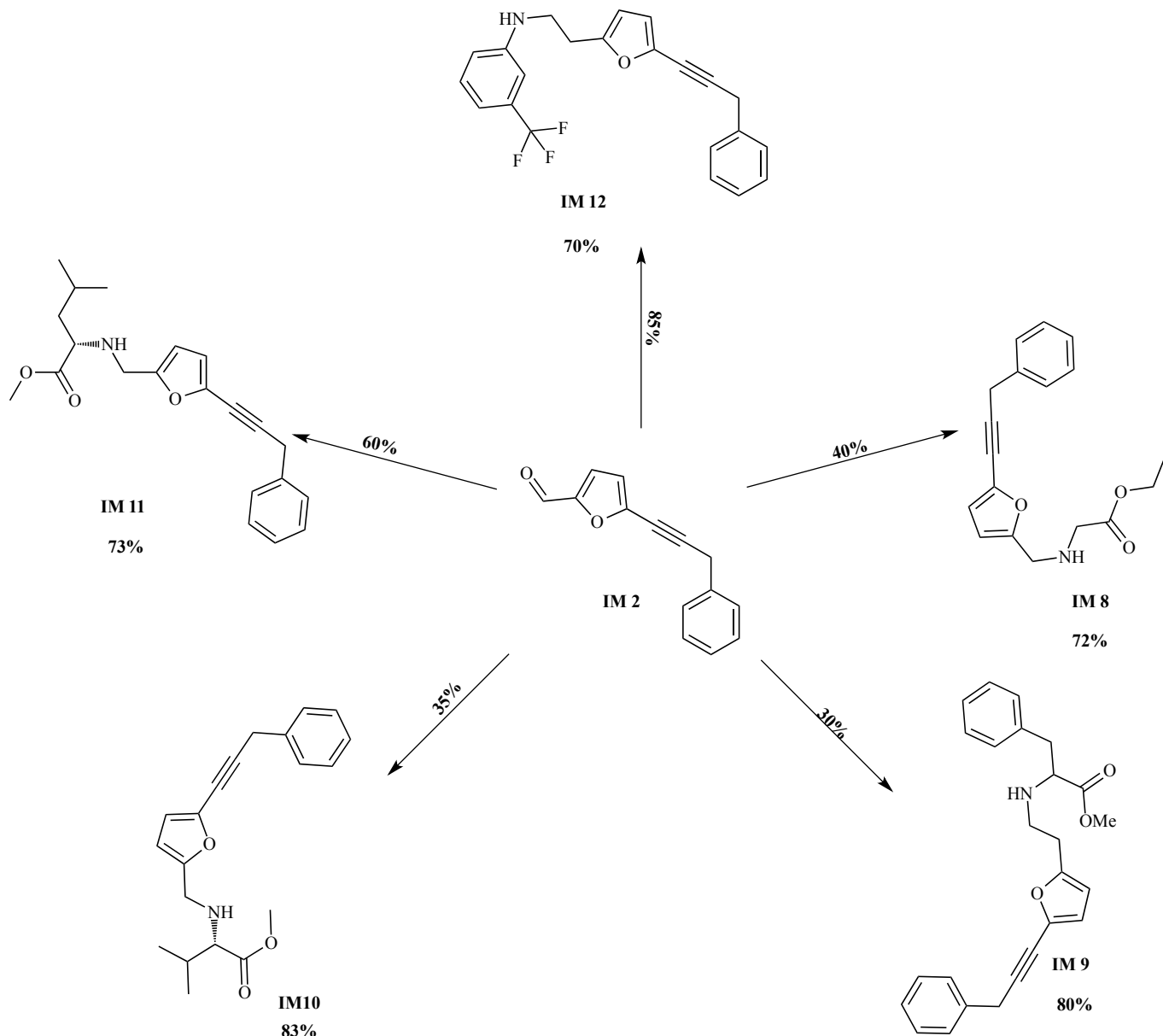
IM2 (0.5 mmol) and corresponding amino acid ester hydrochloride (5eq) were dissolved in CH₃OH (15 mL), then NaBH₃CN (2eq) was added. The mixture was then stirred at room temperature until the starting material disappeared. The evolution of the reaction was monitored by thin-layer chromatography (TLC). At the end of the reaction, the solvent was removed, the residue was washed with distilled water and extracted 3 times with diethyl ether. The combined organic phases were then dried on MgSO₄ and filtered. After removal of the solvent, the residue was purified by column chromatography using diethyl ether-cyclohexane (60:40), (45:55), (45:55) to give the corresponding product (Scheme 2).

2.5. General procedure for the preparation of IM9

L-Phenylalanine methyl ester hydrochloride (1eq) and IM2 (0.5 mmol) were dissolved in CH₃OH (15 mL). Once everything was dissolved, NaBH₃CN (2eq) was added. The mixture was then stirred at room temperature. The reaction was followed by TLC. At this stage, the reaction was treated in the same manner as the IM8 product. The residue was purified by column chromatography with cyclohexane-ether diethyl (55:45) (Scheme 2).



Scheme 1. Vilsmeier haak formylation of IM2.



Scheme 2. IM2 analogues hemisynthesis.

2.6. General Procedure for the Preparation of IM 12

IM2 (1 mmol) and 3-(Trifluoromethyl) aniline (1eq) were dissolved in CH_3OH to which a few drops of acetic acid were added. NaBH_3CN (1eq) was subsequently added under agitation. The reaction took place at room temperature and

was followed by TLC. At the end of the reaction, the solvent was evaporated and the residue had undergone the same treatment as the previous compounds. The raw product was purified by column chromatography using a mixture of cyclohexane-ether diethyl (80:20) as eluent (Scheme 2).

Table 1. Ligands properties and energy minimization of Carlina oxide and synthesized analogues.

Ligands	Molecular weight g/mol	Toxicity	TPSA		Log P	Log S	Energie (Kcal/mol)
			H donn	H acc			
IM2	182.22	no	0	0	2.87	-4.18	-2888.18710
IM8	311.38	no	1	2	3.18	-5.01	-3902.2628
IM9	373.45	no	1	2	4.01	-6.31	-5825.1593
IM10	325.41	no	1	2	3.43	-5.21	-4895.31
IM11	339.43	no	1	2	3.82	-6.04	-5175.16
IM12	355.36	no	1	0	6.08	-6.95	-4667.8431

2.7. Preparation and Optimization of Both Enzymes and Inhibitors

A molecular docking simulation study was performed using Molecular Operating Environment software (MOE) [28]. The energy minimization was carried out under the following conditions: Temperature=300 °K, pH=7, geometry was realized using the field values of MMFF94x and Hamiltonian AM1. The X-ray crystallographic structure of the mature streptococcal cysteine protease, mSpeB, DHFR from *Enterococcus faecalis*, and *Escherichia coli* DNA gyrase (PDB: 2UZJ, 4M7U, 1KZN) respectively, was downloaded from the protein data bank. The water molecules were removed and the receptor was prepared for the docking study. A triangular matcher algorithm with rescoring GBVI/WSA dG were applied. Synthesized compound structures were built and registered in their 3D conformation. The protein is considered rigid, while the ligand is considered flexible.

The minimized energy of ligands and their toxicity are shown in (Table 1. Fig 1) shows the active site of the enzymes with the molecule of co-crystallization.

2.8. Docking and Building Complexes

The validated docking protocol was used to study ligand receptor interactions at the active site of the newly synthesized compounds to predict their binding mode and affinity. Following the formation of the ligand-receptor complex, it will adapt the most stable conformation according to the lowest energy level. The results were finally examined to determine the most potent and effective antibacterial inhibitor by visualizing various ligand interactions in the binding pocket.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemistry

The steps elaborated during this work were, in the beginning, the formylation of Vilsmeier-Haack on the Furano group of Carlina oxide, in order to have an aldehyde (Scheme 1). Thereafter, the aldehyde was used to create an N-C bond by a reductive amination by using amino acid ester hydrochloride to obtain the corresponding analogues (Scheme 2). The desired compounds (IM2, IM8, IM9, IM10, IM11, IM12) were obtained mixed with by-products (B-P2, B-P8, B-P9, B-P10, B-P11, B-P12), respectively. The by-

products could not be eliminated due to the same Rf of the desired product (Scheme 3).

3.1.1. 5-(3-Phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-carbaldehyde (IM2)

As shown in Scheme 1, the formylation reaction of Vilsmeier Haack gave a mixture of two inseparable compounds per chromatographic column whose appearance is a yellow oil with a yield of 64% by Method 1 and 67% by Method 2.

IM2: (method1): 70%. (method2): 90%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 1678 (C=O, Aldehyde), 2825 (C-H, aldehyde), 2229 (C≡C), 1590, 1485; ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz): 9.64 (s, 1H), 7.42-7.30 (m, 5H) 7.25 (d, 1H $J=3.6\text{Hz}$), 6.70 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 3.92 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 177.19, 152.14, 142.19, 134.99, 128.81, 128.04, 127.14, 116.44, 112.35, 95.94, 72.22, 25.90.

B-P2: (method1): 30%; (method2): 10% IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 697 (C-Cl). ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz): 9.64 (s, 1H), 7.42-7.30 (m, 5H ar + H furano), 7.16 (d, 1H, $J=3.9\text{Hz}$), 6.57 (s, 1H), 3.87 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 177.31, 155.51, 150.81, 139.21, 136.07, 129.27, 128.86, 127.18, 123.24, 115.51, 112.61, 47.04.

3.1.2. {[5-(3-Phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]-amino}-acetic acid ethyl ester (IM8)

Glycine ethyl ester hydrochloride produced 59.4 mg (40%) of orange oil composed of IM8 and by-product B-P8.

IM8: 72% IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 3340 (N-H), 2230 (C≡C). 1737 (C=O ester), ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.27 - 7.44 (m, 5H), 6.50 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 6.23 (d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 4.23 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.08 (s, 1H), 1.32 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 172.05, 153.80, 136.92, 136.80, 128.65, 128.03, 126.83, 115.05, 108.57, 92.05, 73.05, 60.90, 49.78, 45.66, 25.86, 14.24.

B-P8: 28%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 698 (C-Cl) ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.27 - 7.44 (m, 5H), 6.89 (d, $J=3.4\text{Hz}$, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.30 (d, $J=3.4\text{Hz}$, 1H), 4.23 (q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.46 (s, 2H), 2.08 (s, 1H), 1.32 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 172.11, 151.97, 149.97, 136.74, 131.80, 129.18, 128.65, 127.10, 116.11, 111.05, 109.7, 60.90, 49.72, 46.64, 25.86, 14.24.

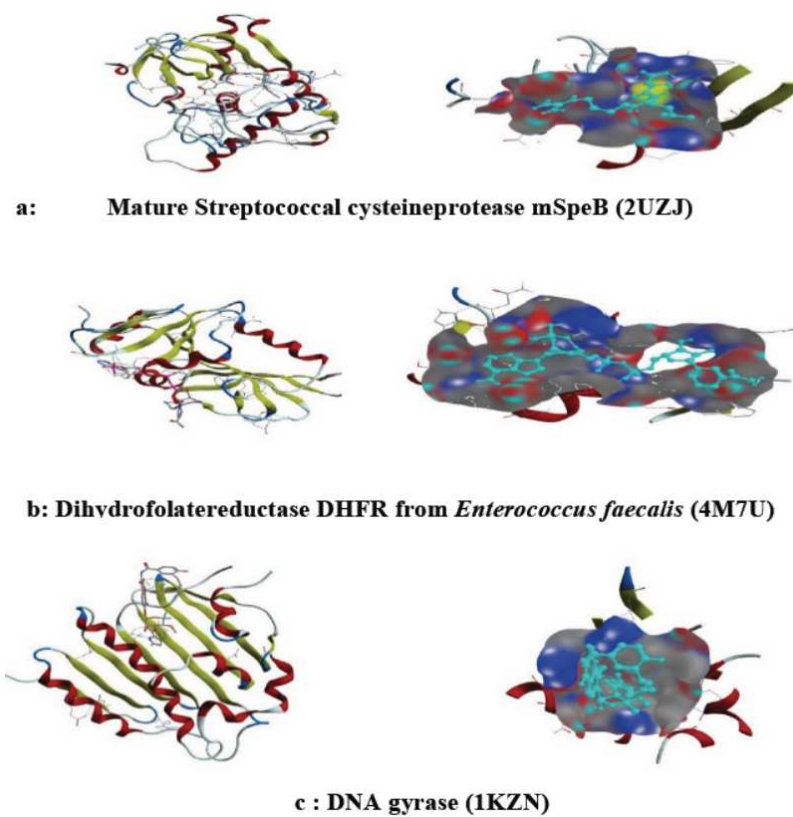
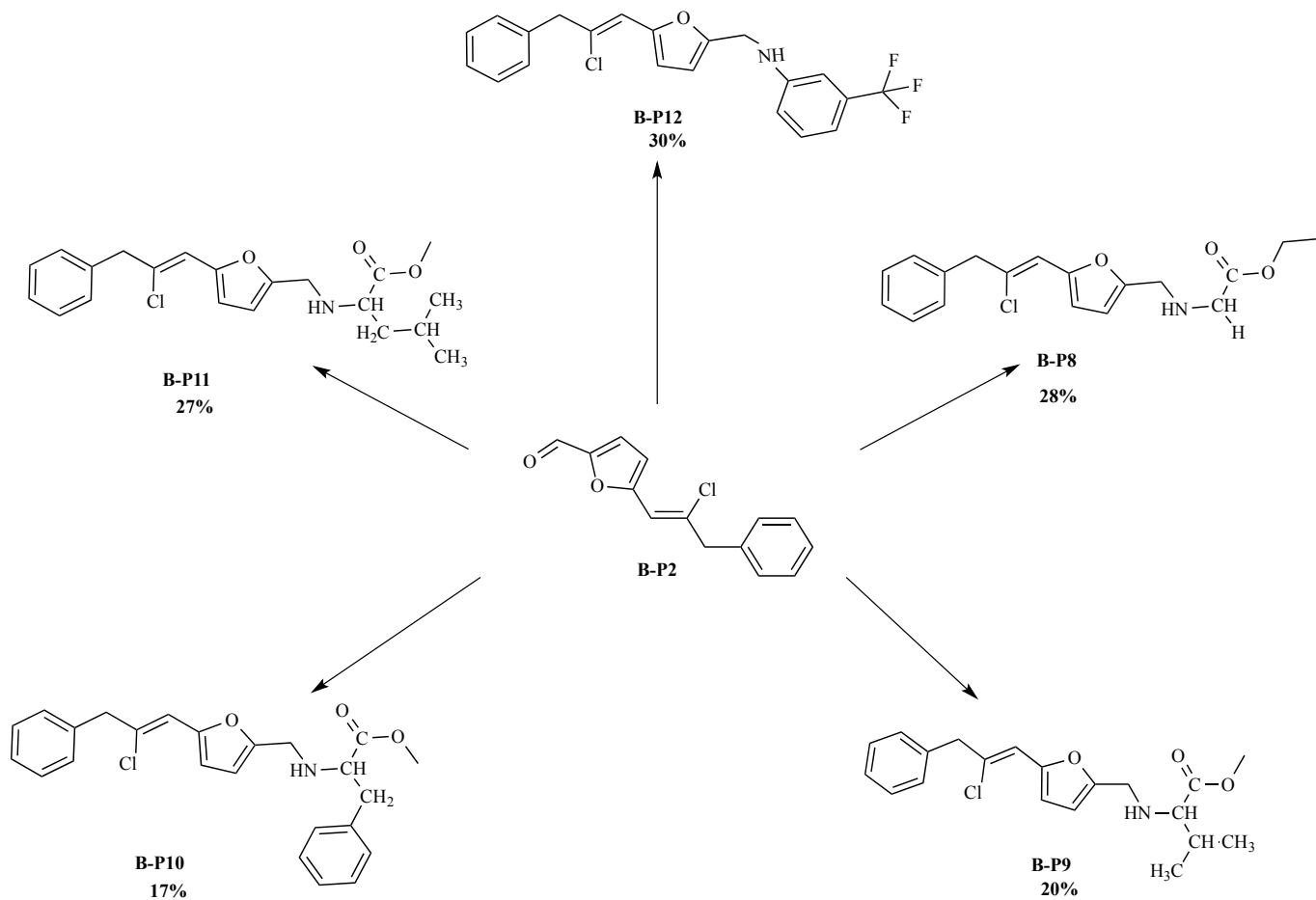


Fig. (1). Simplified model of enzymes and site active isolated.



Scheme 3. By-product of reductive amination.

3.1.3. 3-Phenyl-2-[[5-(3-phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-yl-meth-yl]-amino]-propionic acid methyl ester (IM9)

Using phenylalanine methyl ester hydrochloride, a mixture of IM9 and B-P9 was obtained. Appearance: orange oil. Yield: 30%.

IM9: 80%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 3338 (N-H), 2232 (C \equiv C), 1734 (C=O ester) ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.43 – 7.06 (m, 10H), 6.47 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.11 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.62 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.02 (d, $J = 20$ Hz, 2H) 2.01 (s, 1H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 174.54, 153.82, 137.02, 136.65, 129.18, 128.67, 128.51, 128.05, 126.85, 115.06, 108.42, 91.98, 73.10, 61.79, 51.84, 44.78, 39.61, 25.89.

B-P9: 20% .IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 699 (C-Cl) ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.43 – 7.06 (m, 10H), 6.86 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.19 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 3.62 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 3.02 (d, $J = 20$ Hz, 2H) , 2.01 (s, 1H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 174.51, 153.82, 137.02, 136.65, 135.98, 129.18, 128.52, 127.18, 126.85, 115.06, 111.06, 108.6, 61.79, 51.84, 44.79, 39.61, 25.89.

3.1.4. 3-Methyl-2-[[5-(3-phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]-amino]-butyric acid methyl ester (IM10)

A yellow oil composed of IM10 and B-P10 was obtained using Valine methyl ester hydrochloride with a yield of 35%.

IM 10: 83%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 3338 (N-H), 2232 (C \equiv C), 1734 (C=O ester) ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz) : δ 7.42 – 7.30 (m, 5H), 6.50 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.11 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 1.98 (h, $J = 13.4$, 6.7 Hz, 1H $^+$ 1H NH), 1.00 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 175.22, 154.41, 136.51, 136.00, 128.65, 128.04, 126.83, 115.11, 108.23, 91.90, 73.15, 66.42, 51.60, 45.45, 31.72, 25.88, 19.18, 18.56

B-P10: 17%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 698 (C-Cl) ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz), δ , ppm (J, Hz) : δ 7.42 – 7.30 (m, 5H), 6.89 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.28 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.71 (s, 2H), 3.11 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 1.98 (h, $J = 13.4$, 6.7 Hz, 1H $^+$ 1H NH), 0.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H), 0.96 (d, $J = 2.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 175.22, 152.57, 149.70, 137.10, 131.51, 129.16, 128.65, 127.08, 116.16, 111.10, 109.37, 66.26, 51.59, 46.65, 31.69, 25.88, 19.10, 18.60

3.1.5. 4-Methyl-2-[[5-(3-phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-yl-methyl]-amino]-pentanoic acid methyl ester (IM 11)

Leucine methyl ester hydrochloride gave a mixture of IM11 and B-P11 as a yellow oil with a yield of 60%

IM11: 73%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 3336 (N-H), 2230 (C \equiv C), 1733 (C=O ester). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.42 – 7.27 (m, 5H), 6.49 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.93 (s, 1H), 1.84 – 1.71 (m, $J = 13.1$, 6.5 Hz, 1H), 1.53 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.96 (d, $J = 1.9$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 176.02, 154.13, 136.60, 135.98, 128.64, 128.03, 126.83, 115.08, 108.34, 91.92, 73.12, 59.06, 51.80, 44.92, 42.75, 25.87, 24.86, 22.75, 21.20.

B-P11: 27%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 698 (C-Cl). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.42 – 7.27 (m, 5H), 6.49 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.28 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.37 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 1.93 (s, 1H), 1.84 – 1.71 (m, $J = 13.1$, 6.5 Hz, 1H), 1.50 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 0.96 (d, $J = 1.9$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 176.02, 152.28, 149.78, 137.08, 131.60, 129.17, 128.64, 127.08, 116.14, 111.8, 109.47, 58.97, 51.80, 46.64, 42.75, 25.87, 24.88, 22.71, 21.23

3.1.6. [5-(3-Phenyl-prop-1-ynyl)-furan-2-ylmethyl]- (3-trifluoromethyl-phenyl)-amine (IM 12)

A Yellow oil mixture was obtained using 3-trifluoromethyl aniline as a starting product. Efficiency was found to be 85%.

IM12: 70% .IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 3421 (N-H), 2230 (C \equiv C), 1616 (C-F). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49 – 7.31 (m, 6H), 7.05 (dd, $J = 7.7$, 0.5 Hz, 1H), 6.96 – 6.92 (m, 1H), 6.86 (dd, $J = 7.2$, 4.5 Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.38 (s, 2H), 3.93 (s, 2H),

^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) -62.70 (s). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 150.02, 147.53, 136.93, 135.90, 131.57, 129.74, 128.73, 128.06, 126.94, 124.37, 116.09, 115.26, 114.53, 111.30, 108.54, 92.47, 72.91, 41.24, 25.88.

B-P12: 30%. IR spectrum (KBr, cm^{-1}) 696(C-Cl). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.49 – 7.31 (m, 6H), 7.05 (dd, $J = 7.7$, 0.5 Hz, 1H), 6.96 – 6.94 (dd, $J = 7.2$, 4.5 Hz, 1H), 6.94 (m, 1H $^+$ 1H furano), 6.51(s,1H), 6.38 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), , 4.38 (s, 2H), 3.85 (s, 2H). ^{19}F NMR (282 MHz, CDCl_3) -62.70 (s). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 152.47, 150.02, 147.65, 137.04, 132.75, 129.74, 129.20, 128.79, 127.17, 124.37, 116.09, 115.92, 114.53, 111.30, 109.4, 109.3, 41.20, 27.06.

3.2. Molecular Docking

Molecular docking is a very interesting means for predicting enzyme-ligand interactions and plays a very important role in the design of new molecules with therapeutic effects.

3.2.1. Mature Streptococcalcysteine proteasem SpeB

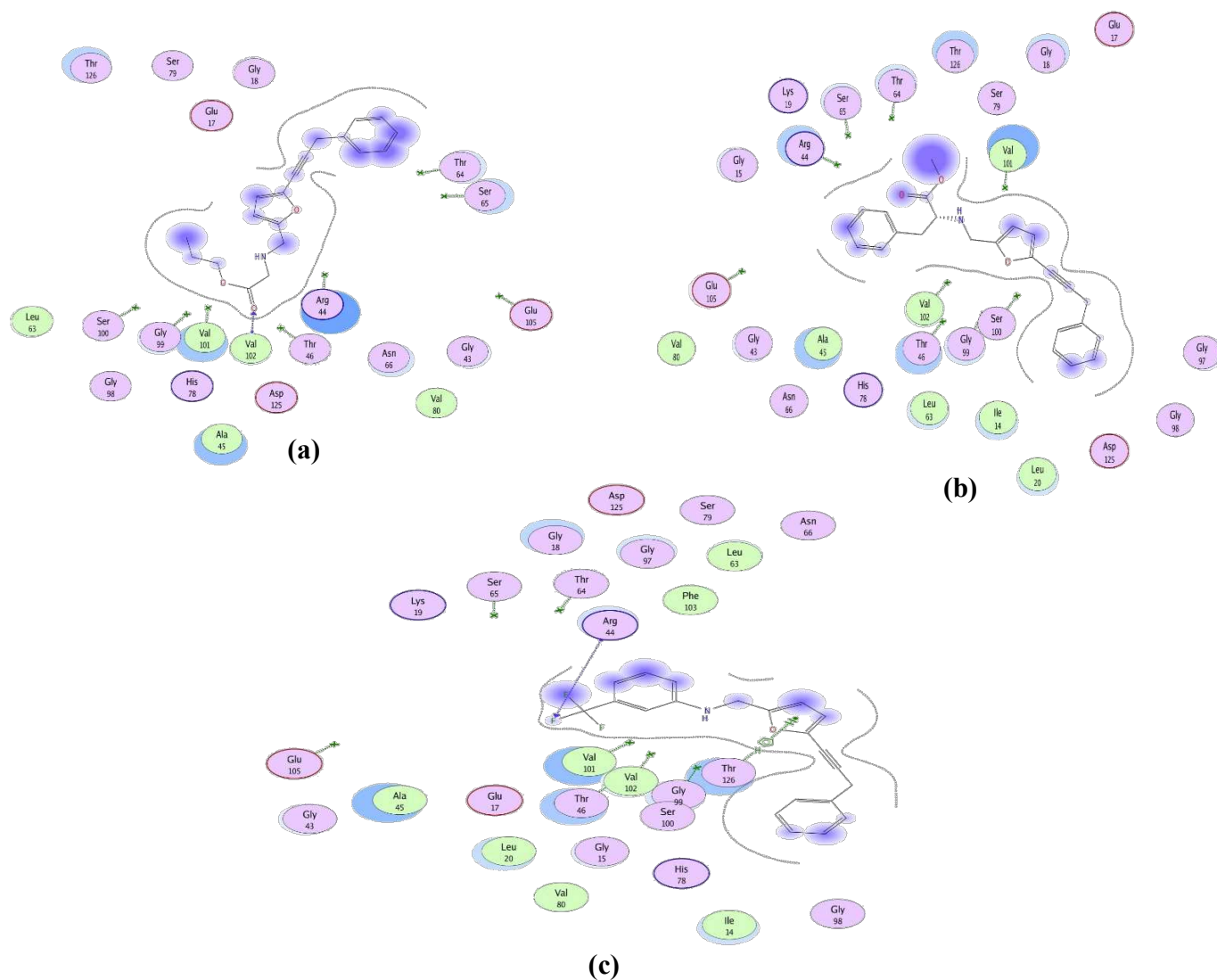
These results show that the complex formed between mSpeB and the IM9 analogue has the lowest energy (-6.32288551 Kcal/mol) and was more active than the complexes formed with the other analogues as well as with Carlina oxide (Table 2).

For complexes mSpeB-IM2, mSpeB-IM10, and mSpeB-IM12: except for the Van der Waals interactions (VDW), which were perceptible, the ligands do not show any other interaction. For the complexes mSpeB- IM8, mSpeB- IM9, and mSpeB-IM11: the analogues interact with the amino acid HIS 195 pi-cation at a distance of 4.59, 4.65 and 4.81 Å, respectively (Fig 2 and Table 2).

Streptococcus pyogenes one of the most common human pathogens. Less than 10% of normal individuals harbor the bacteria, usually in the respiratory tract and skin, without any sign of disease [29]. In recent years, the variety, severity, and sequelae of *Streptococcus pyogenes* infections

Table 2. Energy balance of different complexes (enzyme-ligand) Kcal/mol.

	2UZJ		4M7U		1KZN	
	Score	Rmsd-refine	Score	Rmsd-refine	Score	Rmsd-refine
Ligref	-6.3298	1.5951	-7.9014	2.6476	-8.4386	2.3946
IM2	-4.8777	1.2085	-4.6940	1.2917	-5.4299	0.9631
Im8	-5.9333	2.1819	-5.8233	1.5904	-6.1237	1.8091
Im9	-6.3229	1.6668	-7.4878	2.2864	-6.6749	1.6862
Im10	-6.1176	2.5474	-5.8177	2.4351	-6.0193	1.7480
Im11	-6.2669	1.5162	-7.3378	1.2609	-6.6611	1.6829
Im12	-5.6369	2.2597	-6.6581	2.2953	-6.1715	1.5337

**Fig. (3).** Diagrams of interactions (enzyme-ligands): (A): Diagram interaction of complex DHFR- IM8; (B): Diagram interaction of complex DHFR- IM9; (C): Diagram interaction of complex DHFR- IM12.

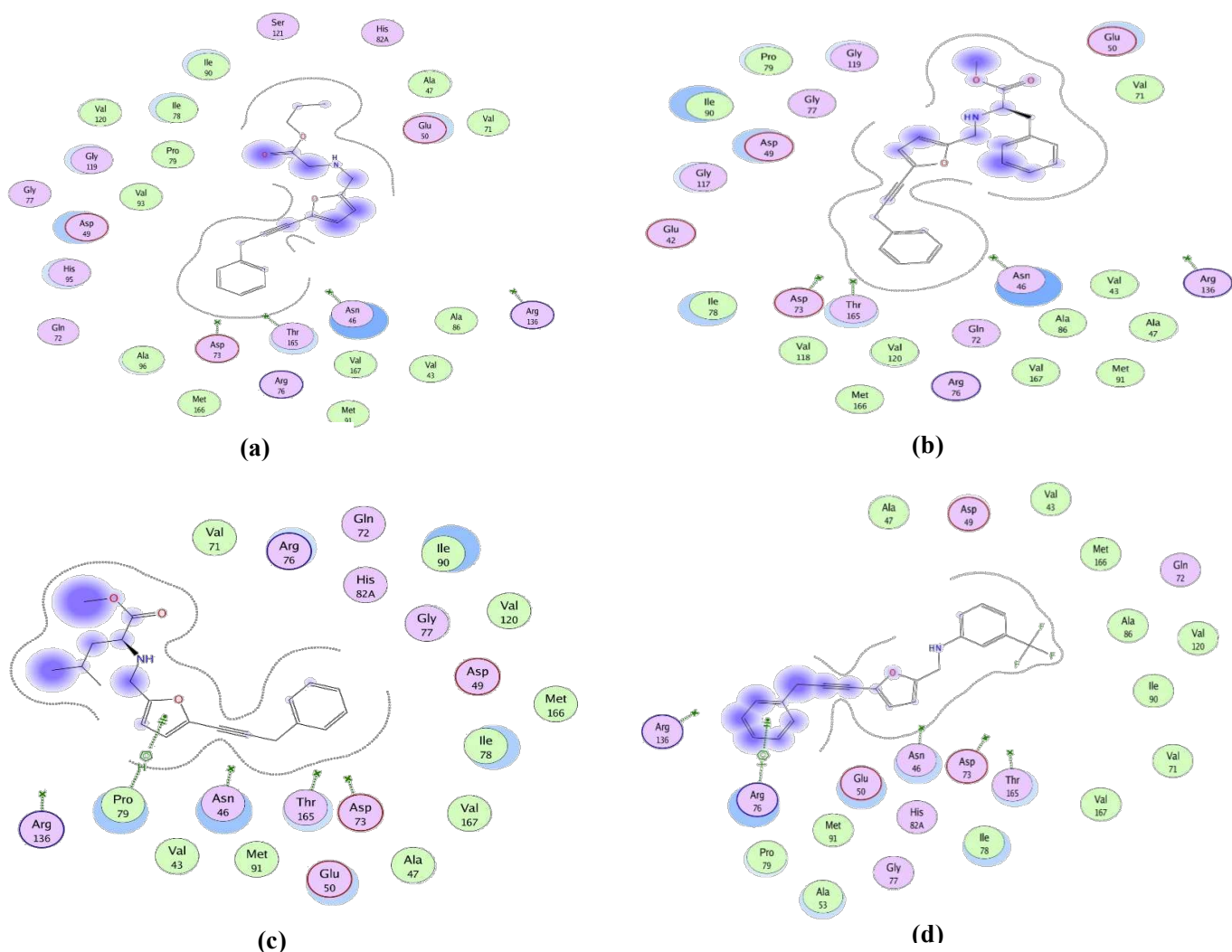


Fig. (4). Diagrams of interactions (enzyme-ligands): (a): diagram interaction of complex DNA gyrase- IM8; (b): diagram interaction of complex DNA gyrase- IM9; (c): diagram interaction of complex DNA gyrase- IM11; (d) : diagram interaction of complex DNA gyrase- IM12.

3.2.3. DNA gyrase

According to Table 2, the complex formed between DNA gyrase and the IM9 analogue has the lowest energy (-6.6749 Kcal/mol) and was more active than the complexes formed with the other analogues as well as with Carlina oxide. For complexes formed with DNA gyrase- IM2, IM9 and IM10 with the only exception of Van der Waals interactions (VDW), which were noticeable, the ligands do not exhibit any other interaction. For the complex DNA gyrase-IM8: the analogue interacts with the amino acid ASN 46 H-donor at a distance of 3.28 Å. For the complex DNA gyrase-IM11: the analogue interacts with the amino acid PRO 79 pi-H at a distance of 4.05 Å.

For the complex DNA gyrase-IM12: the analogue interacts with 2 different sites of the amino acid ARG 76 pi-cation at a distance of 10.97 and 12.93 Å (Table 2 and Fig. 4). DNA gyrase is a main bacterial protein that is implicated in replication and transcription and catalyzes the negative supercoil of circular bacterial DNA. This topoisomerase type II is found in all bacteria. It has been isolated from many bacterial species, but the best characterized gyrase is

Escherichia coli. DNA gyrase is known as an effective target for antibacterial agents, since its blocking induces bacterial death. Quinolones, coumarins, and cyclothialidins are known to have an inhibitory action on this enzyme. Mechanistic experiments and research on gyrase-specific drugs were conducted simultaneously and have proven to be of high interest [36, 37].

CONCLUSION

In conclusion, the authors were able to introduce some modifications to the structure of Carlina oxide while keeping the triple bond, thus, creating new analogues through known chemical pathways. The structures of the new compounds have been confirmed by different spectroscopic methods. Molecular docking has also predicted an interesting inhibitory activity of three enzymes of bacterial origin of almost all analogues, mainly IM9 compared to Carlina oxide, which is known for its antibacterial properties, and also helps to understand, in detail, the various interactions between ligands and enzyme active sites in order to help design new potent inhibitors.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

RESEARCH INVOLVING PLANTS

The authors declare that the species studied is not endangered.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The dataset used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author [Mami I.R.].

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Benabadji N from the University of Tlemcen, Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems, for botanical identification of plants.

REFERENCES

- [1] de Oliveira, C.S.; Lira, B.F.; Barbosa-Filho, J.M.; Lorenzo, J.G.F.; de Menezes, C.P.; dos Santos, J.M.C.G.; Lima, E. de O.; de Athayde-Filho, P.F. Synthesis and Testing of 3-Acetyl-2,5-Disubstituted-2,3-Dihydro-1,3,4-Oxadiazole Derivatives for Antifungal Activity against Selected *Candida* Species. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2013**, *24*(1), 115-120.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532013000100016>
- [2] Demain, A.L.; Vaishnav, P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb. Biotechnol.*, **2011**, *4*(6), 687-699.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x> PMID: 21375717
- [3] Li, J.; Zhang, C.; Gong, M.; Wang, M. Combination of artemisinin-based natural compounds from *Artemisia annua* L. for the treatment of malaria: Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. *Phytother. Res.*, **2018**, *32*(7), 1415-1420.
<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6077> PMID: 29656410
- [4] Shu, Y.Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*(8), 1053-1071.
<http://dx.doi.org/10.1021/np9800102> PMID: 9722499
- [5] Gupta, V.K. *Comprehensive Bioactive Natural Products*; Stadium Press: Texas, **2010**.
- [6] Semmler, F.W. Zusammensetzung Des Atherisohen Oelg Der Eberwurzel (*Carlina acaulis* L.). *Ber.*, **1906**, *39*, 726.
<http://dx.doi.org/10.1002/cber.190603901108>
- [7] Gottlieb, D.; Shaw, P.D. Zusammensetzung Des Atherisohen Oelg Der Eberwurzel (*Carlina acaulis* L.). *Ber.*, **1967**, *39*, p. 726.
- [8] Ashworth, P.J.; Jones, E.R.H.; Mansfield, G.H.; Schlögl, K.; Thompson, J.M.; Whiting, M.C. Researches on Acetylenic Compounds. Part LIX. The Synthesis of Three Polyacetylenic Antibiotics. *J. Chem. Soc.*, **1958**, *0*, 950-954.
<http://dx.doi.org/10.1039/JR9580000950>
- [9] Kononov, D. Polyacetylene Compounds of Plants of the Asteraceae Family. *Pharm. Chem. J.*, **2014**, *48*(9), 615-633.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11094-014-1159-7>
- [10] Minto, R.E.; Blacklock, B.J. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. *Prog. Lipid Res.*, **2008**, *47*(4), 233-306.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2008.02.002> PMID: 18387369
- [11] Wang, Z.C.; Yu, D. Lignan and acetylenic glycosides from *Aster auriculatus*. *Phytochemistry*, **1998**, *48*(4), 711-717.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00019-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00019-3)
- [12] Christensen, L.P.; Lam, J. Acetylenes and Related Compounds in *Cynareae*. *Phytochemistry*, **1990**, *29*(9), 2753-2785.
[http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)87075-6](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)87075-6)
- [13] Shun, S. A.L.K.; Tykwinski, R.R. Synthesis of Naturally Occurring Polyynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*(7), 1034-1057.
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200502071>
- [14] Shun, A.L.; Tykwinski, R.R. Synthesis of naturally occurring acetylenes via an alkylidene carbenoid rearrangement. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*(17), 6810-6813.
<http://dx.doi.org/10.1021/jo034734g> PMID: 12919055
- [15] Gilman, H.; Van Ess, P.R.; Burtner, R.R. The Constitution of *Carlina*-Oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1933**, *55*(8), 3461-3463.
<http://dx.doi.org/10.1021/ja01335a075>
- [16] Eicher, T.; Hauptmann, S.; Speicher, A. The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Syntheses, and Applications. *completely rev., and enl. ed.*, 2nd; Wiley-VCH: Weinheim, **2003**.
- [17] Strzemiński, M.; Wójciak-Kosior, M.; Sowa, I.; Agacka-Mołodoch, M.; Drączkowski, P.; Matusiuk, D.; Kurach, Ł.; Kocjan, R.; Dresler, S. Application of Raman spectroscopy for direct analysis of *Carlina acanthifolia* subsp. *utzka* root essential oil. *Talanta*, **2017**, *174*(174), 633-637.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.070> PMID: 28738633
- [18] Bohlmann, F.; Schuster, A.; Meusel, H. A *Carlina* Oxide Derivative from *Carlina Diae*. *Phytochemistry*, **1981**, *20*(4), 823-824.
[http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85186-2](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(81)85186-2)
- [19] Belabbes, R.; Mami, I.R.; Dib, M.E.A.; Mejdoub, K.; Tabti, B.; Costa, J. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Echinops Spinosus* and *Carlina vulgaris* Rich in Polyacetylene Compounds. *Curr. Nutr. Food Sci.*, **2020**, *16*, 563-570.
<http://dx.doi.org/10.2174/1573401315666190206142929>
- [20] Mejdoub, K.; Mami, I.R.; Belabbes, R.; Dib, M.E.A. DJabou, N.; Tabti, B.; Benyelles, N.G.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical Variability of *Atractylis gummifera* Essential Oils at Three Developmental Stages and Investigation of Their Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities. *Curr. Bioact. Compd.*, **2020**, *16*, 489-497.
<http://dx.doi.org/10.2174/1573407215666190126152112>
- [21] Mami, I.R.; Belabbes, R.; Dib, M.E.A.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Biological Activities of *Carlina* Oxide Isolated from the Roots of *Carthamus caeruleus*. *Nat. Prod. J.*, **2020**, *10*, 145-152.
<http://dx.doi.org/10.2174/2210315509666190117152740>
- [22] Herrmann, F.; Hamoud, R.; Sporer, F.; Tahrani, A.; Wink, M. *Carlina* oxide--a natural polyacetylene from *Carlina acaulis* (Asteraceae) with potent antitrypanosomal and antimicrobial properties. *Planta Med.*, **2011**, *77*(17), 1905-1911.
<http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1279984> PMID: 21678234
- [23] Dordević, S.; Petrović, S.; Dobrić, S.; Milenković, M.; Vucićević, D.; Zizić, S.; Kukić, J. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *109*(3), 458-463.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.021> PMID: 17011148
- [24] Link, P.; Roth, K.; Sporer, F.; Wink, M. *Carlina acaulis* Exhibits Antioxidant Activity and Counteracts A β Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, **2016**, *21*(7), 871.

- <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21070871> PMID: 27384550
- [25] Benelli, G.; Pavela, R.; Petrelli, R.; Nzekoue, F.K.; Cappellacci, L.; Lupidi, G.; Quassinti, L.; Bramucci, M.; Sut, S.; Dall'Acqua, S.; Canale, A.; Maggi, F. Carlina Oxide from *Carlina acaulis* Root Essential Oil Acts as a Potent Mosquito Larvicide. *Ind. Crops Prod.*, **2019**, *137*, 356-366.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.037>
- [26] Pavela, R.; Maggi, F.; Petrelli, R.; Cappellacci, L.; Buccioni, M.; Palmieri, A.; Canale, A.; Benelli, G. Outstanding insecticidal activity and sublethal effects of *Carlina acaulis* root essential oil on the housefly, *Musca domestica*, with insights on its toxicity on human cells. *Food Chem. Toxicol.*, **2020**, *136*111037
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2019.111037> PMID: 31816346
- [27] Saffidine, K.; Sahli, F. Zerroug. Antimicrobial Activity of an Algerian Medicinal Plant: *Carthamus caeruleus* L. *Pharmacogn. Commun.*, **2013**, *3*(4), 71-76.
- [28] *Molecular Operating Environment (MOE)*, **2013**,
- [29] Olsen, J.G.; Dagil, R.; Niclasen, L.M.; Sørensen, O.E.; Kragelund, B.B. Structure of the mature *Streptococcal* cysteine protease exotoxin mSpeB in its active dimeric form. *J. Mol. Biol.*, **2009**, *393*(3), 693-703.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.046> PMID: 19712682
- [30] Berggren, K.; Johansson, B.; Fex, T.; Kihlberg, J.; Björck, L.; Luthman, K. Synthesis and biological evaluation of reversible inhibitors of IdeS, a bacterial cysteine protease and virulence determinant. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*(9), 3463-3470.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.03.026> PMID: 19362485
- [31] Tsai, P.J.; Kuo, C.F.; Lin, K.Y.; Lin, Y.S.; Lei, H.Y.; Chen, F.F.; Wang, J.R.; Wu, J.J. Effect of group A streptococcal cysteine protease on invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.*, **1998**, *66*(4), 1460-1466.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.66.4.1460-1466.1998> PMID: 9529068
- [32] Hawser, S.; Lociuero, S.; Islam, K. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. *Biochem. Pharmacol.*, **2006**, *71*(7), 941-948.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.052> PMID: 16359642
- [33] Antypenko, L.M.; Kovalenko, S.I.; Los, T.S.; Rebec, O.L. Synthesis and Characterization of Novel N - (Phenyl, Benzyl, Hetaryl) - 2 - ([1,2,4]Triazolol[1,5 - c]Quinazolin - 2 - ylthio) Acetamides by Spectral Data, Antimicrobial Activity, Molecular Docking and QSAR Studies. *J. Heterocycl. Chem.*, **2017**, *54*(2), 1267-1278.
<http://dx.doi.org/10.1002/jhet.2702>
- [34] Bourne, C.R.; Wakeham, N.; Webb, N.; Nammalwar, B.; Bunce, R.A.; Berlin, K.D.; Barrow, W.W. The structure and competitive substrate inhibition of dihydrofolate reductase from *Enterococcus faecalis* reveal restrictions to cofactor docking. *Biochemistry*, **2014**, *53*(7), 1228-1238.
<http://dx.doi.org/10.1021/bi401104t> PMID: 24495113
- [35] Oefner, C.; Bandera, M.; Haldimann, A.; Laue, H.; Schulz, H.; Mukhija, S.; Parisi, S.; Weiss, L.; Lociuero, S.; Dale, G.E. Increased hydrophobic interactions of iclaprim with *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase are responsible for the increase in affinity and antibacterial activity. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2009**, *63*(4), 687-698.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp024> PMID: 19211577
- [36] Maxwell, A. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.*, **1997**, *5*(3), 102-109.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(96\)10085-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(96)10085-8) PMID: 9080608
- [37] Lafitte, D.; Lamour, V.; Tsvetkov, P.O.; Makarov, A.A.; Klich, M.; Deprez, P.; Moras, D.; Briand, C.; Gilli, R. DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5' -methyl group of the noviose. *Biochemistry*, **2002**, *41*(23), 7217-7223.
<http://dx.doi.org/10.1021/bi0159837> PMID: 12044152

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

RESEARCH ARTICLE

Chemical Variability and Antioxidant Activities of the Essential Oils of the Aerial Parts of *Ammoides verticillata* and the Roots of *Carthamus caeruleus* and their Synergistic Effect in Combination

Imane Rihab Mami¹, Noria Merad-Boussalah², Mohammed El Amine Dib^{2,*}, Boufeldja Tabti², Jean Costa³ and Alain Muselli³

¹Faculté des Sciences, Département de Chimie, Université de Tlemcen, Laboratoire (COSNA), BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria; ²Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; ³Laboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134 SPE, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corté, France

Abstract: Aim and Objective: Oxidative stress is implicated in the development and progression of many diseases. Some of the appropriate actions that could be taken to resolve the problem of these diseases are search for new antioxidant substances isolated from plants. The aims of this study were to research the intraspecies variations of *A. verticillata* and *C. caeruleus* essential oils from 8 locations using statistical analysis, the in vitro antioxidant properties of collective essential oils and in combinations.

ARTICLE HISTORY

Received: January 16, 2020
Revised: March 25, 2020
Accepted: April 21, 2020

DOI:
10.2174/1386207323666200606213057

Materials and Methods: The essential oils were analyzed by GC and GC-MS. The intraspecies variations of the essential oil compositions were discussed using principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA). The antioxidant properties were evaluated DPPH-radical scavenging activity and β -carotene bleaching test.

Results: The main components of *Ammoides verticillata* collective essential oil (Coll EO) were thymol (30.5%), carvacrol (23.2%), p-cymene (13.1%), limonene (12.5%) and terpinene-4-ol (12.3%). While roots of *Carthamus caeruleus* essential oil were dominated by carline oxide (86.2%). The chemical variability allowed the discrimination of two main Groups for both Coll EOs. A direct correlation between the altitudes, climate and the chemical compositions was evidenced. *Ammoides verticillata* and *Carthamus caeruleus* Coll Eos showed good antioxidant activity. In binary mixture, the interaction between both Coll Eos and between oils rich of thymol and/or carvacrol with carline oxide produced the best synergistic effects compared to individual essential oils and the synthetic antioxidant (BHT).

Conclusion: *Ammoides verticillata* and *Carthamus caeruleus* essential oil blends can be used as a natural food preservative and alternative to chemical antioxidants.

Keywords: Collective essential oils, Antioxidant activities, Synergistic effects, Carline oxide, Thymol, Carvacrol.

1. INTRODUCTION

Antioxidants are compounds capable of delaying or inhibiting the oxidation processes which occur under the influence of atmospheric oxygen or reactive oxygen species. They are used for the stabilization of polymeric products, foodstuffs, cosmetics and pharmaceuticals [1]. Antioxidants

are involved in the defense mechanism of the body against pathologies associated with the attack of free radicals which leads to the development of several chronic diseases including cancer, cardiovascular diseases and disorders associated with aging and diabetes mellitus [2]. Natural products like essential oils are widely used all over the world due to their antioxidant activity which protect human beings from various diseases caused by oxidative stresses. They are preferred over the common synthetic antioxidants that are commercially available as food additives, such as, 2-tertiobutyl-p-hydroxyanisole and 3-tertiobutyl-p-hydroxyanisole (BHA) or 2,6-ditertio-butyl-4-methylphenol (BHT) that are suspected of being potentially dangerous for human health [3].

*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail a_dibdz@yahoo.fr

Table 1. Data relative to harvest locations of *A. verticillata* and *C. caeruleus* from Algeria.

A. verticillata						
Area	Samples	Voucher codes	Locations	Yields (%)	Altitudes	Climate
Area 1	S1	AVAT.05.19	Ain Temouchent	2.3	250	Humid
	S2	AVBR.05.19	Bensekrane	2.8	263	
	S3	AVSS.05.19	Sidi Safi	2.2	220	
	S4	AVBS.05.19	Beni saf	2.1	95	
Area 2	S5	AVZT.05.19	Zarifet	3.2	835	Humid and cooler
	S6	AVAF.05.19	Ain fettouh	2.9	1125	
	S7	AVM.05.19	Mafrouche	2.8	1100	
	S8	AVLS.05.19	Lalla Setti	3.6	1000	
C. caeruleus						
Area	Samples	Voucher codes	Locations	Yields (%)	Altitudes	Climate
Area 1	S1	CCFI.06.19	Fandi	1.9	1500	Humid and cooler
	S2	CCKS.06.19	khmis	2.3	1500	
	S3	CCFR.06.19	Hafir	2.1	1100	
	S4	CCTY.06.19	Terny	1.8	1220	
Area 2	S5	CCBR.06.19	Bensekrane	0.6	263	Dry
	S6	CCAR.06.19	Amieur	0.9	319	
	S7	CCCH.06.19	Chetouane	1.2	600	
	S8	CCOB.06.19	Ouchebe	1,1	775	

Essential oils and their constituents have shown activity suppressing cancer in a number of malignant human cell lines involved in colon cancer, gastric cancer, human liver tumor, lung tumors, breast cancer and glioma [4]. Most of the antioxidant activities in essential oils are found in the oxygenated terpenoids (e.g., alcohols and phenolic terpenes) [5]. Certain preservative agents based on essential oils comprising 50% rosemary, sage and citrus essential oil, and 50% glycerol are already commercially available as a food additive [6]. Formulations based on essential oils of thyme (*Thymus capitatus*), jojoba (*Simmondsia californica*) and rosemary (*Rosemarinus officianalis*) are frequently used as non-toxic preservatives [7]. *A. verticillata* it is an aromatic and medicinal plant belonging to the Apiaceae family. Annual hail species with a filiform strain, with highly branched stems 10 to 40 cm high, it experiences a late dynamic cycle from May to July. *A. verticillata* is a medicinal plant which contains active substances of definite therapeutic interest [8]. The roots are diuretic in nature and the seeds possess excellent aphrodisiac properties [9]. Significant variation in chemical composition of essential oils from different regions was observed in many pieces of research. In any case, the main component of the whole plant is generally thymol or carvacrol [9-12]. *C. caeruleus* belongs to Asteraceae family, is a species that can be found in the field, prefers dry, sunny places in the Mediterranean basin and is native to Asia, but has spread throughout the rest of the world [13].

The roots of *C. caeruleus* are traditionally used to help heal burns and treat skin diseases [14], and are used against inflammations articular and are highly against diseases such

as irritable bowel syndrome for cancer patients. The more recent publication that concerned the essential oils of *C. caeruleus* showed that Carlina oxide was the major constituent [15]. Despite works on the chemical composition of *A. verticillata* and *C. caeruleus* essential oils, to the best of our knowledge, there are no results on the chemical variability and the antioxidant activities in combination of their essential oils. Therefore, the aims of this study were to study the intraspecies variations of *A. verticillata* and *C. caeruleus* essential oils from 8 locations using statistical analysis, A principal component analysis (PCA) and a cluster analysis (CA; dendrograms) were applied to identify the possible relationships between the composition of essential oils and environmental factors, the in vitro antioxidant properties of collective essential oils and combination with oils rich in majority components.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Plant Material and Essential Oils Extraction

A. verticillata (Aerial parts) and *C. caeruleus* (Roots) were collected in Western Algeria during flowering (May–July 2019). Voucher specimens were deposited in the herbarium of the University of Tlemcen. The geographical origin of the different samples and the voucher number of each specimen analyzed for both species are listed in Table 1. Essential oils were obtained by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia.

2.2. Analysis Conditions

2.2.1. Gas Chromatography (GC)

Analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 μm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (poly-ethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. The injector and detector temperatures were maintained at 280°C. The essential oils were injected in the split mode (1/50), using hydrogen as the carrier gas (0.7 mL min⁻¹); the injection volume was 0.2 μL . The retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software.

2.2.2. Gas Chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)

Essential oils were analyzed using a Perkin Elmer Turbo mass detector (quadrupole) coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with Rtx-1 fused silica capillary columns and Rtx-Wax (poly-ethyleneglycol), (ion source temperature, 150°C; ionization energy, 70 eV). Ionization energy MS were acquired over a mass range of 35-350 Da (scan time, 1 s). Other GC conditions were the same as described for GC, except the split was 1/80.

2.2.3. Component Identification and Quantification

Identification of individual components was accomplished by comparing their GC retention indices (RIs) on nonpolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data [16, 17] and through computer matching with commercial mass spectral libraries [18,19] and also by comparing the spectra obtained with those of the in-house laboratory library. The quantification of essential oils and blend was performed using peak normalization (%) abundances calculated by integrating FID response factors relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard.

2.3. Determination of Antioxidant Activity

2.3.1. DPPH: Free Radical Scavenging Assay

To study the anti-free radical activity of essential oils and combinations, we opted for the method which uses DPPH (diphenyl picryl-hydrazyl) as a relatively stable free radical, according to the protocol described by Que et al. (2006) [20]. A volume of 2 ml of the DPPH solution (0.1mM) was mixed with 2 ml of the extract solutions or the standard antioxidant (BHT) at different concentrations (1 to 70 g/l). After 30 minutes of incubation in the dark and at room temperature, the absorbance was read at 517 nm. In the binary mixtures, a ratio of 1: 1 by volume was mixed for each combination and a series of concentrations ranging from 1 to 50 g/L were prepared. The percentage of anti-radical activity was calculated according to the following equation:

$$(\%) = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

where Ac is the absorbance of the control reaction (without extracts), and As was the absorbance in the presence of

extracts. IC₅₀'s were calculated graphically by the linear regression of plotted graphs; inhibition percentages as a function of different concentrations extracts tested. Tests were carried out in triplicate [20].

2.3.2. β -Carotene Bleaching Assay

The capacity of essential oils and blends to prevent the bleaching of β -carotene is determined according to the method described by Bougateg et al (2009). Briefly, 0.5 mg of β -carotene in 1 ml of chloroform was mixed with 25 μl of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. The chloroform was evaporated under reduced pressure at 45 °C. in a rotary evaporator, then 100 ml of distilled water saturated with oxygen was added and the mixture obtained was stirred vigorously. The reaction medium contains 2.5 ml of the β -carotene/linoleic acid emulsion and 0.5 ml of the solutions of extracts or the antioxidant reference (BHT). The mixture was placed in a water bath and incubated at 50 °C for 2 hours. The oxidation of the previous emulsion was followed by measuring the absorbance of each sample just after its preparation (t = 0 min) and at intervals of 15 min until the end of the experiment (t = 120 min) at 470 nm. The negative control contains 0.5 ml of distilled water in place of essential oils and the standard antioxidant. The antioxidant activity (%) was expressed as a percentage of inhibition compared to the negative control according to the following equation:

$$\% = [1 - (At_0 - At_{120}) \text{ test} / (At_0 - At_{120}) \text{ control}] \times 100$$

At₀: absorbance at time t = 0; At₁₂₀: absorbance at time t = 120 min. IC₅₀'s were calculated graphically by the linear regression of plotted graphs; inhibition percentages as a function of different concentrations extracts tested. Tests were carried out in triplicate [21].

2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis of variance (ANOVA) was performed using the SAS software and means were separated using the Least Significant Difference (LSD) test at P \leq 0.05. Analysis of each test was performed in triplicate. Data analyses were performed using PCA and CA. Both methods aim at reducing the multivariate space in which objects (oil samples) are distributed but are complementary in their ability to present results. Indeed, PCA provides the data for diagrams in which both objects (oil samples) and variables (oil components) are plotted while canonical analysis informs a classification tree in which objects (sample locations) are gathered. PCA was carried out using function 'PCA' from the statistical R software. The variables (components) have been selected using function from the statistical software. The CA produced a dendrogram (tree) using the Ward's method of hierarchical clustering, based on the Euclidean distance between pairs of oil samples.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Yields and Chemical Compositions of *A. verticillata* Essential Oils

The essential oil yields of populations collected from the study area are shown in Table 1. Essential oil yields varied from 2.1% to 3.1% (w/w), among populations, based on

fresh weight. The highest yield (3.6%) was observed in the region of Lalla Setti (S8) (humid and cooler region located at 1000 m altitude), while the lowest (2.1%) was observed in the region of Beni saf (S4) (humid region located at 185 m altitude). Based on the difference between the yields of essential oils, the eight sites were classified into two orders (Table 1).

Order 1: Low yield of essential oils (S1 to S4) in regions with low altitude and humid climate.

Order 2: High yield of essential oils (S5-S8) in regions with high altitude and a humid and cooler climate.

By comparing our results with those reported in the literature, we note that the yields of our essential oils are almost identical [22]. From our results, we notice that the difference in altitude had an effect on the yields of essential oils. For this purpose, the cultivation of *A. verticillata* in high altitude and humid climate sites seems to be suitable for obtaining optimal essential oil yields (Table 1).

All individual oil samples were pooled to produce a "Collective Essential Oil" (EO Coll.) that was used to perform detailed analysis using GC and GC-MS. Analysis of Coll EO of aerial parts accounted for 99.4% of the total oil, and allowed the identification of 12 compounds (Table 2). All components were identified by comparison of their EI-MS and GC with those of our laboratory produced Arômes library. Among them, ten monoterpenes and 2

sesquiterpenes. Coll EO was dominated by a high percentage of monoterpene compounds (99.1%) in which oxygenated compounds (79.1%) were higher than hydrocarbon compounds (20.0%). The major components were thymol (30.5%), carvacrol (23.2%), p-cymene (13.1%), limonene (12.5%), terpinene-4-ol (12.3%) and γ -terpinene (6.5%) (Table 2). A cluster analysis (CA; dendrograms) (Fig. 1) and principal component analysis (PCA) (Fig. 2) were applied to identify the possible relationships between the composition of essential oils and environmental factors, in particular the geographic origins of the samples. The data presented in Fig. (1) (CA) were obtained from the correlation matrix and the standardized matrix linking the compositions of essential oils to the locations of the samples. The dendrogram (CA) suggests that there are two main groups of *A. verticillata* essential oils. A group comprising the samples of zone 1 oils (Group 1) (S1-S4) and a group comprising the samples of zone 2 (group 2) (S5-S8) (Fig. 1). The results of PCA (Fig. 2) confirmed the existence of two main groups. Group 1 with humid climate and lowest altitudes showed carvacrol (isomer of thymol) was most abundant (33.2-46.5%). On the other hand, group II with high altitudes and humid and cooler climate showed that thymol had an abundance which varied from 33.2 to 46.5% (Fig. 2, Table 2). The differences observed in the chemical composition of our essential oils may be due to ecological factors or many other factors, such as type of soil and climatic conditions [22].

Table 2. Chemical variability of *A. verticillata*

No. ^a	Compounds	/RI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Coll EO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	Identification ^e
1	α -Thujene	932	925	1012	tr	-	-	-	-	0.3	0.4	1.1	0.8	RI, MS
2	α -Pinene	931	932	1023	0.4	0.6	0.8	0.1	0.5	0.7	0.8	0.2	0.1	RI, MS
3	Sabinene	964	966	1118	0.1	0.1	0.2	0.6	tr	0.2	0.1	tr	0.3	RI, MS
4	Myrcene	976	982	1159	0.5	0.5	0.7	1.2	0.6	0.7	4.1	6.5	8.1	RI, MS
5	p-Cymene	1010	1012	1259	13.1	25.2	19.2	22.1	17.5	19.5	17.5	12.5	13.5	RI, MS
6	Limonene	1020	1021	1195	12.5	28.1	19.3	16.5	21.5	19.3	12.5	10.4	9.5	RI, MS
7	γ -Terpinene	1047	1049	1237	6.5	9.6	11.1	8.6	10.5	11.1	13.1	9.5	6.5	RI, MS
8	Terpinene-4-ol	1161	1162	1583	12.3	0.8	1.1	2.1	0.6	0.8	0.5	0.8	1.2	RI, MS
9	Thymol	1266	1269	2189	30.5	tr	tr	tr	0.1	28.2	32.5	45.3	40.3	RI, MS
10	Carvacrol	1282	1278	2220	23.2	33.2	44.3	46.2	46.5	13.1	9.5	8.6	12.5	RI, MS
11	α -Humulene	1456	1456	1665	0.1	0.1	0.1	0.6	0.2	0.2	0.1	tr	0.5	RI, MS
12	γ -Muuroleone	1471	1469	1679	0.2	0.2	tr	0.1	0.3	tr	0.1	0.2	0.1	RI, MS
Identification %					99.4	98.4	96.8	98.1	98.3	94.1	91.2	95.1	93.4	
Hydrocarbon monoterpenes					20.0	64.1	51.3	49.1	50.6	51.8	48.5	40.2	38.8	
Oxygenated monoterpenes					79.1	34.0	45.4	48.3	47.2	42.1	42.5	54.7	54.0	
Hydrocarbon sesquiterpenes					0.3	0.3	0.1	0.7	0.5	0.2	0.2	0.2	0.6	

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). ^b Retention indices of literature on the apolar column (RI) r. ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp). ^e RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode. Coll EO: collective essential oil. Min: minimum. Max: Maximum.

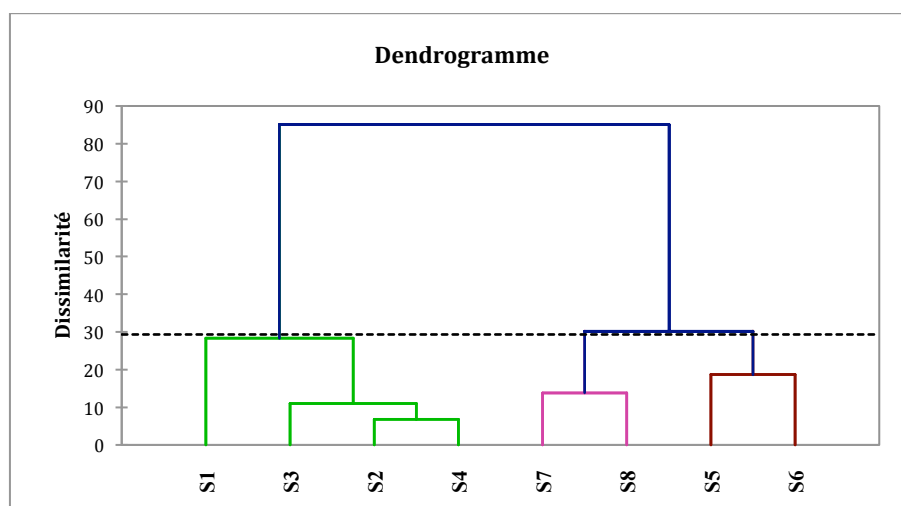


Fig (1). Cluster analysis (CA) of chemical compositions of *A. verticillata* from Algeria.

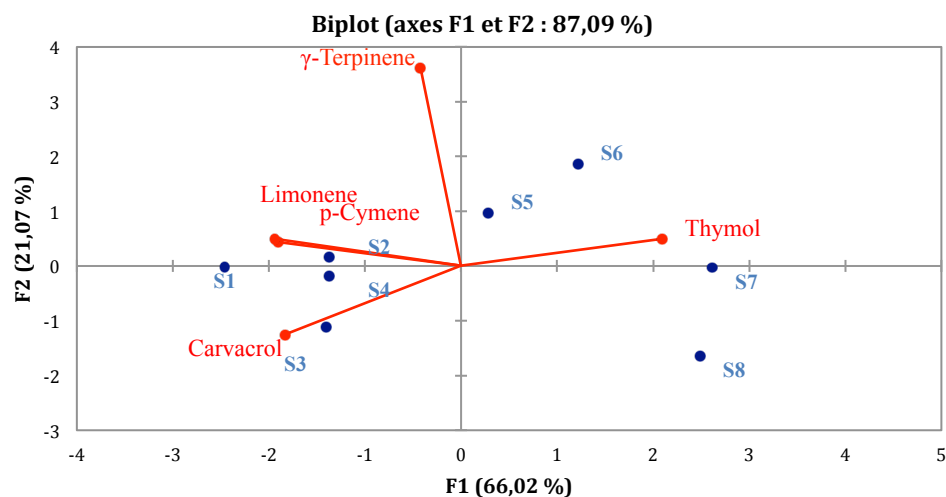


Fig. (2). Principal component analysis (PCA) of chemical compositions of *A. verticillata*. S: Stations.

Table 3. Chemical composition of essential of *C. caeruleus* roots.

No. ^a	Components	IRI _a ^b	RI _a ^c	RI _p ^d	Coll EO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	Identification ^e
1	Carlina oxide	-	1580	2380	86.2	83.2	75.3	79.5	92.1	96.1	95,3	86,5	86,6	RI, MS
2	13-Methoxy carlina oxide	1798	1800	2104	5.3	2.1	8.6	6.5	1.2	0.1	1,2	6,5	6,5	RI, MS
3	Hexadecanoic acid	1942	2005	1944	4.3	11.2	14.2	6.3	0.5	0.1	0,6	3,2	5,8	RI, MS
% Identification					95,8	96,5	98,1	92,3	93,8	96,3	97,1	96,2	98,9	

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). ^b Retention indices of literature on the apolar column (IRI). ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp). ^e RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode. Coll EO: collective essential oil. Min: minimum. Max: Maximum.

3.2. Yields and Chemical Compositions of *C. caeruleus* Essential Oils

The extraction yields were calculated relative to the mass of the fresh material. We note that the samples from stations located at altitude and humid and cooler climate (S1-S4) were higher essential oil yields (1.8 to 2.3%) than those collected at low altitude and dry climate (S5-S8), whose yields were between 0.6 and 1.2% (Table 1). The GC and

GC-MS analysis of Coll EO from the roots led to the identification of 3 components: carlina oxide (86.2%), 13-methoxy carlina oxide (5.3%) and hexadecanoic acid (4.3%) (Table 3). The 8 samples were analyzed in order to study the chemical variability of essential oils from *C. caeruleus* from Algeria. The chromatographic profiles of the samples were substantially identical. Acetylenic compound constituted the dominant chemical class (75.3-96.1%) of the total composition of essential oils (Table 3).

Table 4. Antioxidant activity of individual Coll Eos and in combination.

Microorganisms	IC ₅₀ (g/L)			BHT
	<i>A. verticillata</i>	<i>C. caeruleus</i>	<i>A. verticillata</i> / <i>C. caeruleus</i>	
	Coll EOs		Coll EOs	
	Individual		1:1 Combination	
DPPH	15,2 ± 1,5	26.5 ± 0,9	8.2 ± 0,9	16.3 ± 0,8
β-carotene bleaching test	2,3 ± 0,8	4.7 ± 0,2	0.6 ± 0,6	4,6 ± 0,5
Values are represented as mean ± SEM				

3.3. Evaluation of Antioxidant Activity of Individual Coll Eos and in Combination

The half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) of the essential oils are shown in Table 4. In the present study, both Coll EOs studied showed antioxidant activities. Compared to the synthetic antioxidant, *A. verticillata* Coll EO showed the highest antioxidant activity when evaluated by the β-carotene bleaching and DPPH methods with inhibition values of IC₅₀s of 2,3 and 15,2 g/L, respectively. On the other hand, *C. caeruleus* Coll EO presented good activity antioxidant (IC₅₀s of 4.7 and 26.5 g/L, respectively) but which remains lower to synthetic antioxidant the BHT when looking to its values (IC₅₀s of 4.6 and 16.3 g/L, respectively).

Coll EOs blend was very effective compared to the individual essential oils by both methods β-carotene bleaching and DPPH that showed a significant increase antioxidant activity. The IC₅₀s of Coll EOs blend were 0.6 and 8.2 g/L, which is about 7 and 2 times higher than the synthetic antioxidant used as references, respectively (IC₅₀s = 4.6 g/l and 16.3 g/l, respectively) (Table 4). In general, the Coll EOs of *A. verticillata* and *C. caeruleus* tested individually showed high antioxidant activities compared to the synthetic antioxidant. In binary mixture, the interaction between both Coll EOs significant synergistic effects. This result can be explained by the synergistic effect resulting from the main constituents of the mixture of *A. verticillata* and *C. caeruleus*, that is to say between the thymol (30.5%), carvacrol (30.5%), p-cymene (13.1%) and carlina oxide (95.8%).

3.4. Evaluation of Antioxidant Activity of Individual Essential Oils (Rich in Thymol/Carvacrol and Carlina Oxide) and in Combination

The antioxidant activity evaluated by the β-carotene bleaching and DPPH methods of *A. verticillata* essential oil of station S7 containing thymol (45.3%) and p-cymene (12.5%) showed the greatest antioxidant activity (IC₅₀s = 5.5 g/l and 32.1 g/l, respectively) than that of the essential oil of station S5 containing carvacrol (44.3%) and p-cymene (19.2%) (IC₅₀s = 8.3 g/l and 76.2 g/l, respectively) but which remains lower than synthetic antioxidant. *C. caeruleus* essential oil of station (5) indicated the highest activity, with an IC₅₀s of 2.7 and 6.5 g/l, which is about twice higher than the synthetic antioxidant used as a reference (Table 5). In binary mixture, essential oil blends were very effective compared to the individual essential oils tested. The combination of *A. verticillata* and *C. caeruleus* essential oils

showed a significant increase in antioxidant activity (Tables 5 and 6). However, it seems that the combination of thymol (45.3%) and P-cymene (12.5%) with carlina oxide (63.1%) increases the antioxidant activity (IC₅₀ of 2.3 g/l and 13.2 g/l, respectively) that was higher than the synthetic antioxidant used as reference (IC₅₀ = 4.6 g/l and 16.3 g/l, respectively), tested by β-carotene bleaching and DPPH (Table 5). On the other hand, the combination of carvacrol (44.2%) and P-cymene (19.2%) with carlina oxide (63.1%) was less effective with IC₅₀s of 18.2 g/l and 4.1 g/l, but which remains almost equal to the synthetic antioxidant, respectively (Table 6). In the present study, it was observed the association of phenolics (thymol, carvacrol and P-cymene) with the acetylenic component exhibited a very strong antioxidant power, far superior to the synthetic antioxidant BHT. While, the association of carvacrol and P-cymene with carlina oxide had the same antioxidant power as the BHT (additive activity). Essential oils are natural plant products containing complex mixture of components and thus having multiple biological properties. Most antioxidant activity in essential oils appears to derive from oxygenated terpenoids, particularly phenolic terpenes, phenylpropanoids and alcohols.

Thymol, carvacrol, and eugenol are the most powerful antioxidants present in the essential oils examined, and their effects on food are among their benefits to human health [23,24]. Carlina oxide is an acetylenic compound; it is present mainly in the essential oil of *Carlina acanthifolia* [25], *Carlina diae* [26], *Carlina vulgaris* [13], *Atractylis gummifera* [27] and *Carthamus caeruleus* [15]. Several studies have been conducted on different biological activities provided by this compound which has shown very promising antimicrobial, antitrypanosomal, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities [13,15,27-30]. Only a few studies of the synergistic effect of essential oils have been documented. Grosso *et al.* [31] suggested that the combination of thymol, carvacrol and thymoquinone in the volatile oil of *Satureja montana* may be responsible for the increase in antioxidant activity, using the DPPH radical scavenging and rancimat methods. Benyoucef *et al.* [32] suggested that the combination of *T. fontanesii*, *A. herba-alba* and *R. officinalis* essential oils showed the greatest antioxidant activity with an IC₅₀ of 2.6 mg/L almost equal to the synthetic antioxidant (BHT). Antioxidant efficacy of essential oils of some spices and herbs in combination showed synergistic interactions.

The evaluation of different possible combinations of these herbs showed that combination of coriander/cumin seed oil produced synergistic interactions [33]. The

Table 5. Antioxidant activity of individual essential oils (rich in thymol and carlina oxide) and in combination.

Microorganisms	IC ₅₀ (g/L)			BHT
	<i>A. verticillata</i> (S7)	<i>C. caeruleus</i> (S5)	<i>A. verticillata/ C. caeruleus</i> (S7) + (S5)	
	Individual		1:1 Combination	
DPPH	32,1 ± 2,6	6.5 ± 0,9	13.2 ± 0,6	16.3 ± 0,8
β-carotene bleaching test	5,5 ± 0,8	2.7 ± 0,2	2.3 ± 0,1	4,6 ± 0,5

Values are represented as mean ± SEM

Table 6. Antioxidant activity of individual essential oils (rich in carvacrol and carlina oxide) and in combination

Microorganisms	IC ₅₀ (g/L)			BHT
	<i>A. verticillata</i> (S2)	<i>C. caeruleus</i> (S5)	<i>A. verticillata/ C. caeruleus</i> (S2) + (S5)	
	Individual		1:1 Combination	
DPPH	76.2 ± 5,5	6.5 ± 0,9	18.2 ± 3,6	16.3 ± 0,8
β-carotene bleaching test	8,3 ± 1,8	2.7 ± 0,2	4.1 ± 2,6	4,6 ± 0,5

Values are represented as mean ± SEM

antioxidant potential of these mixtures to increase by synergistic interactions between the different antioxidant compounds present in the mixture of essential oils. However, very little is known about the mechanism of interactions which are responsible for the synergistic antioxidant activity [34].

CONCLUSION

In conclusion, the essential oil yields of *A. verticillata* and *C. caeruleus* showed significant variability. Results showed the positive correlation between essential oil yield, altitude and climate, it reached to greatest content in site with high altitude and humid and cooler climate. A high level of percentage of acetylenic compound (Carlina oxide) was found in *C. caeruleus* from Algeria. Cluster and PCAs, demonstrated that altitude and climate affect considerably the chemical composition of *A. verticillata*. It can be hypothesized that high altitude and humid climate produced essential oils rich to carvacrol, while at low altitude, humid and cooler climate, the essential oil is rich to thymol. The individual essential oils of *A. verticillata* and *C. caeruleus* demonstrated great antioxidant activities. In binary mixture, the combination of essential oils rich in thymol/carvacrol, p-cymene and carlina oxide presented high antioxidant activities. On the other hand, *A. verticillata* and *C. caeruleus* Coll EOs blend displayed important synergistic effects to far superior to that of the synthetic antioxidant used as a reference (BHT). This increase in activity may be due to the association of the four main components, thymol, carvacrol, p-cymene and carline oxide. Thus *A. verticillata* and *C. caeruleus* essential oils combinations may be used as a potential source of safe and potent natural antioxidant agents in pharmaceutical and food industries.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

RESEARCH INVOLVING PLANTS

The authors declare that species studied is not endangered.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

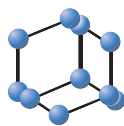
The authors would like to thank the Algerian general direction for research (DGRSDT) and Benabadji N from University of Tlemcen, Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems, for their help and botanical identification of plants.

REFERENCES

- [1] Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990**, *280*(1), 1-8. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90510-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(90)90510-6) PMID: 2191627
- [2] Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.*, **2010**, *4*(8), 118-126. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.70902> PMID: 22228951
- [3] Zarkovic, N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Aspects Med.*, **2003**, *24*(4-5), 281-291. [http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00023-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00023-2) PMID: 12893006

- [4] DeAngelis, L.M. Brain tumors. *N. Engl. J. Med.*, **2001**, 344(2), 114-123.
http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200101113440207 PMID: 11150363
- [5] Vági, E.; Rapavi, E.; Hadolin, M.; Vásárhelyiné Perédi, K.; Balázs, A.; Blázovics, A.; Simándi, B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53(1), 17-21.
http://dx.doi.org/10.1021/jf048777p PMID: 15631502
- [6] Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **2004**, 94(3), 223-253.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2004.03.022 PMID: 15246235
- [7] Dayan, F.E.; Cantrell, C.L.; Duke, S.O. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17(12), 4022-4034.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046 PMID: 19216080
- [8] Felidj, M.; Bouazza, M.; Ferouani, T. Short paper about the floristic community and the interest of *Ammoides pusilla* (verticillata), a medicinal plant from Mounts of Tlemcen National Park (Western Algeria). *Geo Eco Trop*, **2010**, 34, 147-154.
- [9] Attou, A.; Davenne, D.; Benmansour, A.; Lazouni, H.A. Chemical Composition and Biological Activities of *Ammoides verticillata* Essential Oil from West Algeria. *Phytotherapie*, **2017**, 17(1), 2-8.
http://dx.doi.org/10.3166/phyto-2019-0116
- [10] El Ouariachi, M.; Tomi, P.; Bouyanzer, A.; Hammouti, B.; Desjobert, J.M.; Costa, J.; Paolini, J. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. *Food Chem. Toxicol.*, **2011**, 49(2), 533-536.
http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.019 PMID: 21093522
- [11] Chahal, K.K.; Dhaiwal, K.; Kumar, A.; Kataria, D.; Singla, N. Chemical composition of *Trachyspermum ammi* L. and its biological properties: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, **2017**, 6(3), 131-140.
- [12] Balbaa, S.I.; Hilal, S.H.; Haggag, M.Y. The volatile oil from the herb and fruits of *Carum copticum* at different stages of growth. *Planta Med.*, **1973**, 23(4), 312-320.
http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1099450 PMID: 4732115
- [13] Belabbes, R.; Mami, I.R.; Dib, M.E.A.; Mejdoub, K.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Echinops spinosus* and *Carlina vulgaris* rich in polyacetylene compounds. *Curr. Nutr. Food Sci.*, **2019**.
http://dx.doi.org/10.2174/1573401315666190206142929
- [14] Saffidine, K.; Sahli, F.; Zerroug, M. Antimicrobial activity of an Algerian medicinal plant: *Carthamus caeruleus* L. *Pharmacogn. Commun.*, **2013**, 3(4), 71-76.
- [15] Mami, I.R.; Belabbes, R.; Dib, M.E.A.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Biological Activities of *Carlina Oxide* Isolated from the Roots of *Carthamus caeruleus*. *Nat. Prod. J.*, **2019**.
http://dx.doi.org/10.2174/2210315509666190117152740
- [16] Adams, R.P. *Identification of essential oils by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectroscopy; Allured Publ. Corp: Carol Stream; III*, **2001**.
- [17] König, W.; Joulain, D.; Hochmuth, D. *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils; Library of Mass Finder 2.1*; Institute of Organic Chemistry, University of Hamburg, **2001**.
- [18] Mc Lafferty, F.; Stauffer, D. *Wiley Register of Mass Spectral Data/Mass spectrometry library search system bench-Top/PBM, Version, 6th Ed.*, **1994**.
- [19] *Standards, N.I.O. Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library*, **1999**.
- [20] Que, F.; Mao, L.; Pan, X. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res. Int.*, **2006**, 39, 581-587.
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2005.12.001
- [21] Bougatef, A.; Hajji, M.; Balti, R.; Lassoued, I.; Triki-Ellouz, Y.; Nasri, M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.*, **2009**, 114, 1198-1205.
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075
- [22] Tefiani, C.; Riazi, A.; Youcefi, F.; Aazza, S.; Gago, C.; Faleiro, M.L.; Pedro, L.G.; Barroso, J.G.; Figueiredo, A.C.; Megías, C.; Cortés-Giraldo, I.; Vioque, J.; Miguel, M.G. *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils: Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *J. Essent. Oil Res.*, **2015**, 27(2), 1-9.
http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2015.1006739
- [23] Amerah, A.M.; Ouwehand, A.C. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. *Use of essential oils in poultry production*; Elsevier, **2016**, pp. 101-110.
- [24] Elgndi, M.A.; Filip, S.; Pavlič, B.; Vradić, J.; Stanojković, T.; Žižak, Ž.; Zeković, Z. Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja Montana* L., *Coriandrum sativum* L. and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluids*, **2017**, 128, 128-137.
http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.025
- [25] Strzemeski, M.; Wójciak-Kosior, M.; Sowa, I.; Agacka-Mołodoch, M.; Drączkowski, P.; Matosiuk, D.; Kurach, Ł.; Kocjan, R.; Dresler, S. Application of Raman spectroscopy for direct analysis of *Carlina acanthifolia* subsp. *utzka* root essential oil. *Talanta*, **2017**, 174(174), 633-637.
http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.070 PMID: 28738633
- [26] Bohlmann, F.; Schusterp, A.; Meusel, H.A. *Carlina oxide* derivative from *Carlina diae*. *Phytochemistry*, **1981**, 20(4), 823-824.
http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(81)85186-2
- [27] Mejdoub, K.; Mami, I.R.; Belabbes, R.; Dib, M.E.A. DJabou, N.; Tabti, B.; Benyelles, N.G.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical variability of *Atractylis gummifera* essential oils at three developmental stages and investigation of their antioxidant, antifungal and insecticidal activities. *Curr. Bioact. Compd.*, **2019**.
http://dx.doi.org/10.2174/1573407215666190126152112
- [28] Herrmann, F.; Hamoud, R.; Sporer, F.; Tahrani, A.; Wink, M. *Carlina oxide*--a natural polyacetylene from *Carlina acaulis* (Asteraceae) with potent antitrypanosomal and antimicrobial properties. *Planta Med.*, **2011**, 77(17), 1905-1911.
http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1279984 PMID: 21678234
- [29] Dordević, S.; Petrović, S.; Dobrić, S.; Milenković, M.; Vucićević, D.; Zizić, S.; Kukić, J. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, 109(3), 458-463.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.021 PMID: 17011148
- [30] Link, P.; Roth, K.; Sporer, F.; Wink, M. *Carlina acaulis* exhibits antioxidant activity and counteracts A β toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, **2016**, 21(7), 871.
http://dx.doi.org/10.3390/molecules21070871 PMID: 27384550
- [31] Grosso, C.; Oliveira, A.C.; Mainar, A.M.; Urieta, J.S.; Barroso, J.G.; Palavra, A.M. Antioxidant activities of the supercritical and conventional *Satureja montana* extracts. *J. Food Sci.*, **2009**, 74(9), C713-C717.
http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01376.x PMID: 20492105
- [32] Benyoucef, F.; Dib, M.E.A.; Arrar, Z.; Costa, J.; Muselli, A. synergistic antioxidant activity and chemical composition of essential oils from *Thymus fontanesii*, *Artemisia herba-alba* and *Rosmarinus officinalis*. *J. Appl. Biotechnol. Rep.*, **2018**, 5(4), 151-156.
http://dx.doi.org/10.29252/JABR.05.04.03
- [33] Bag, A.; Chattopadhyay, R.R. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PLoS One*, **2015**, 10(7)e0131321
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131321 PMID: 26132146
- [34] Sonam, K.S.; Guleria, S. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Products. *Ann. Pharmacol. Pharm.*, **2017**, 2(8)1086.

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

Biological Activities of Carlina Oxide Isolated from the Roots of *Carthamus caeruleus*



Imane Rihab Mami¹, Rania Belabbes², Mohammed El Amine Dib^{2,*}, Boufeldja Tabti², Jean Costa³ and Alain Muselli³

¹Laboratoire of Organic Chemistry, Natural Substances and Analyses (COSNA), University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria; ²Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, Chetouane Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; ³Laboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134 SPE, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corté, France

Abstract: Background: *Carthamus caeruleus* belongs to the Asteraceae family. The roots are traditionally used as healing agents. They help to heal burns and treat skin diseases. They are also used against joint inflammation and are very effective against diseases such as irritable bowel syndrome for cancer patients.

Objectives: The purpose of this work was i) to study the chemical composition of i) the essential oil and hydrosol extract of *Carthamus caeruleus*, ii) to isolate the major component of both extracts and iii) to evaluate their antioxidant, antifungal and insecticidal activities.

Methods: The essential oil and hydrosol extract obtained from the roots were studied by GC and GC/MS. The antioxidant activities were performed using two different methods i) Radical scavenging activity (DPPH) and ii) the Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP), using BHT as a positive control. Whereas, the antifungal activity of the essential oil and Carlina oxide was investigated against plant fungi. The fumigation toxicity of *C. caeruleus* essential oil besides Carlina oxide was evaluated against adults of *Bactrocera oleae* better known as the olive fly.

Results: The essential oil and hydrosol extract were mainly represented by acetylenic compounds such as carline oxide and 13-methoxy carline oxide. Carlina oxide was isolated and identified by ¹H and ¹³C NMR spectroscopic means. The results showed that Carlina oxide presented interesting antioxidant and antifungal properties, while *C. caeruleus* root essential oil had better insecticidal activity. Furthermore, Carlina oxide has demonstrated promising *in vivo* antifungal activity to control infection of apples by *Penicillium expansum*.

Conclusion: Carlina oxide can be used as a natural food preservative and alternative to chemical fungicides to protect stored apple against *Penicillium expansum*.

Keywords: *Carthamus caeruleus*, essential oil, hydrosol extract, carlina oxide, biological activities, food preservative.

1. INTRODUCTION

Antioxidants are substances naturally present in the body, capable of protecting it from harmful influences, especially oxidation reactions, also known as oxidative stress. They are used in food, cosmetics and pharmaceuticals fields [1]. In addition, most of the common synthetic antioxidants that are commercially available as food additives, such as, 2-tert-Butyl-p-Hydroxyanisole (BHA) or Butylated Hydroxytoluene (BHT) are suspected of being potentially dangerous to human health [2].

On the other hand, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, and *Alternaria alternata* are ubiquitous fungal pathogens in the environmental damage to most of fruits, vegetables and ornamentals [3]. Phytosanitary interventions are the main measures to reduce the incidence of both pre- and post-harvest diseases.

Pesticides have adverse effects on the environment due to their high toxicity and promote the development of resistant strains. Awareness of the environmental cost of these practices and consumers fears of the potential danger of pesticide residues to human health is generating growing interest in other control alternatives.

Essential oils have been shown to inhibit the development of microbial pathogens that infect various soil and

Received: October 09, 2018
Revised: January 02, 2019
Accepted: January 03, 2019

DOI:
10.2174/2210315509666190117152740



CrossMark

*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Tlemcen, Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail a_dibdz@yahoo.fr

Table 1. Data relative to harvest locations of *C. caeruleus* from Algeria.

Samples	Locations	GPS Coordinates	No. Voucher code	Yields	Altitudes (m)
S1	Beni snous (Fandi)	34°38'35"N; 1°33'41"O	C.C-0516-DMA1	1.6	835
S2	Beni snous (khmis)	34°38'27"N; 1°33'19"O	C.C-0516-DMA2	1.3	840
S3	Ouchebea	34°54'11"N; 1°12'47"O	C.C-0516-DMA3	1.1	775
S4	Terny	4°47'45"N; 1°21'29"O	C.C-0516-DMA4	1.5	854
S5	Sabra	34°49'39"N; 1°31'42" O	C.C-0516-DMA5	0.09	593
S6	Bouhlou	34°49'30"N; 1°36' 28"O	C.C-0516-DMA6	1.6	837
S7	Chetouane	34°55'12"N; 1°17'10"O	C.C-0516-DMA7	0.06	600
S8	Beni bahdel	34°43'00"N; 1°31'00"O	C.C-0516-DMA8	0.09	600
S9	EL Aricha	34°13'22"N; 1°15'21"O	C.C-0516-DMA9	2.5	1148
S10	Sebdou	34°38'22"N; 1°19'37"O	C.C-0516-DMA10	2.6	951

airborne cultures. Studies have shown that combined treatments of thyme, cumin and *Lactobacillus plantarum* oils have been successful in controlling infections caused by fungal strains belonging to the genus *Botrytis* [3]. Essential oils have a very wide spectrum of action since they inhibit the growth of bacteria as well as those of fungi and yeasts. In many countries, essential oils were studied for their effectiveness as natural preservatives for foods [3].

The genus *Carthamus* belongs to Asteraceae family and comprises of 25 species distributed from the Mediterranean region to Asia. They are annual perennial plants, most often very thorny.

C. caeruleus (synonymous: *Carduncellus caeruleus*) is an uncommon species that can be found in the field, prefers dry, sunny places in the Mediterranean basin and is native to Asia, but has spread throughout the rest of the world [4]. The most common species found in Algeria are: *C. caeruleus*, *C. daumasianus*, *C. fauvei* and *C. doumerguei* [5, 6]. *C. caeruleus* is a species similar to the thistle, also known as the «cardoncelle bleue», it is uncommon and likes fields and uncultivated land. The roots of *C. caeruleus* are traditionally used to help heal burns and treat skin diseases [7], and are used against inflammations articular and are highly against diseases such as irritable bowel syndrome for cancer patients.

To our knowledge, the chemical composition of *C. caeruleus* essential oil has not been studied. This study aimed to assess i) the chemical composition of volatile metabolites contained in essential oils of *C. caeruleus* roots native to western Algeria, ii) isolated the major components and iii) to evaluate their antioxidant, antifungal and insecticidal activities.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Plant Material

Roots of *C. caeruleus* were harvested at the flowering stage (May) from 10 locations of Tlemcen (Algeria) where it

grows in abundance. Voucher specimens (C.C.1-10; 08.05.18) were deposited with the Herbarium of the University of Tlemcen (Algeria). Some information of samples locations (harvest locations, altitudes) as well as yields of essential oil is presented in Table 1.

2.2. Essential Oils and Hydrosol Isolation

Plant material was submitted to hydrodistillation for 5 h using Clevenger type apparatus. For the chemical analysis and biological activities, essential oils were stored in dark glass bottles at 4°C. Hydrosol extract was obtained according to the method of Belabbes *et al.* [8]. In brief, the first 500 mL of water from hydrodistillation was recovered in order to obtain the corresponding hydrosol [8]. Hydrosol extract was obtained by liquid-liquid extraction with diethyl ether. After evaporation of the solvent, hydrosol extract was dried over Na₂SO₄.

2.3. Isolation of Components

The Collective oil (1 g) was separated using silica gel column chromatography (FC, silica gel 200-500 lm) and eluted with Hexane, then with hexane/EtOAc (3:1). Two compounds were obtained: Compound (1) (0.8 g) and compound (2) (0.12 g).

2.4. Analysis Conditions

GC analyses were carried out using a Perkin Elmer Autosystem XL GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and fused Rtx-1 silica capillary columns (60 m × 0.22 mm i.d., 0.25 µm film thickness; polydimethylsiloxane). The oven temperature was programmed to increase from 60-230°C at 2°C/min and was then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. The injection volume was 0.1 µL, as previously reported by Dib *et al.* [9].

Gas chromatography-mass spectrometry analysis: Samples were analyzed using a Perkin Elmer Turbo mass detector (quadrupole) coupled to a Perkin Elmer Autosystem XL

equipped with Rtx-1 fused silica capillary columns and Rtx-Wax (ion source temperature, 150°C; ionization energy, 70 eV). Ionization energy MS was acquired over a mass range of 35–350 Da (scan time, 1 s). Other GC conditions were the same as described for GC, except the split was 1/80, as previously reported by Dib *et al.* [9].

The identification of each compound of the mixtures was carried out by comparison: (i) retention indices calculated respectively on polar and apolar columns with those of standard compounds (laboratory library "Arôme") or those reported in the literature; (ii) mass spectra (electronic impact) with those of standard compounds (laboratory library) or those present in computerized banks [10, 11]. Quantification of constituents was performed using a Flame Ionization Detector by internal standardization of peak areas using the calculated response factors relative to the tridecane (0.7 g.100 g⁻¹) used as an internal standard, according to the method described by Belabbes *et al.* [8] and adapted within the CPN laboratory.

2.5. DPPH Free Radical Scavenging Assay

The free radical-scavenging activities of extracts were measured using the DPPH test, according to the previously published report [8]. A volume of 100 µl of different concentrations (2.5 to 50 mg/L) of each extract was added to 25 µL of the methanolic solution of DPPH (0.5 mM) freshly prepared. After incubation in the dark for 30 min and at room temperature, the absorbance was measured with a spectrophotometer at 517 nm. Reference standard (BHT) was also analyzed using the same procedure. The neutralization percentage (I%) of the DPPH radical was calculated according to the following formula:

$$I\% = [A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}] \times 100$$

where A_{blank} is the absorbance of the control reaction (without extracts), and A_{sample} was the absorbance in the presence of extracts. IC₅₀'s were calculated graphically by the linear regression of plotted graphs; inhibition percentages as a function of different concentrations extracts tested. Tests were carried out in triplicate [8].

2.6. Ferric-Reducing Antioxidant Power Assay

The reducing power of iron (Fe³⁺) in the extracts was determined by the method described by Oyaizu [12]. One milliliter of the extract at different concentrations (from 0.5 to 50 mg/L) was mixed with 2.5 mL phosphate buffer solution (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of a solution of potassium ferricyanide K₃Fe(CN)₆ to 1%. The whole was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. In the end, 2.5 mL of the supernatant of each concentration was mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of FeCl₃ · 6H₂O (0.1%). After 30 min of incubation, the absorbances were measured at 700 nm using a visible dual-beam spectrophotometer against ethanol (80%) as blank. BHT was used as a positive control. Analyses were achieved in triplicates.

2.7. Antifungal Activities

2.7.1. Pathogenic Fungal Strains

The fungal isolates, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus flavus* and *Rhizopus oryzae*, causing olive rot, have been isolated directly from

fruit in orchards. All isolated fungal species were transferred to 9 cm petri dishes sterilized with lactic acid (20%) to stop growth of the strains. The plates were incubated at 25 °C ± 2°C for 14 days in the dark. Each fungal strain was identified on the basis of their morphological and microscopic characters using the following reference [13, 14].

2.7.2. In Vitro Antifungal Assay

The antifungal activity of extracts tested against fungi strains was performed by the direct contact technique (Singh *et al.* [15]). Final concentrations ranging from 10 to 100 mg/L were obtained by adding 0.5 mL of solutions previously prepared in a tube containing 9.5 mL of PDA medium at a temperature between 45 and 50 °C. After homogenization using a vortex, the contents of the tubes were poured into Petri dishes. The boxes were allowed dry for 15 to 20 minutes. A petri dish containing 10 mL of PDA medium without extract was used as a negative control. A mycelial disc of 9 mm of diameter, cut from the periphery of the 5-day pre-culture, was inoculated aseptically into the center of each Petri dish. All petri dishes were sealed with sterile parafilm and incubated at 28 °C for 9 days. The effectiveness of the treatment was evaluated daily by measuring the average of the two perpendicular diameters of each colony. The percentage inhibition of growth of the two fungi tested, relative to the control, was calculated to 9th day, using the following formula [16].

$$I\% = (DC - DT / DC) \times 100$$

where DC is the diameter of the mycelial growth of the negative control, DT is the average diameters of fungal colony of treatment.

2.7.3. In Vivo Antifungal Assay

The *in vivo* antifungal activity of the essential oil and Carlina oxide on wound-inoculated apples was carried out using the method of Tian *et al.* [17]. Apples were selected according to their maturity, uniformity and especially the absence of visible symptoms of rot on their surface. Using a cotton-bud, 10⁶ spore/mL of the fungal inoculum prepared beforehand, was scrapped on the surfaces of the colonies and was resuspended in distilled water containing 0.5% Tween 80. Filter papers of 4 cm of diameter were impregnated of 0.01 mg of essential oil and Carlina oxide and placed into polystyrene containers (1L) (without any solvent) to reach a final concentration of 0.01 mg/L air. Control experiments were performed without any treatment.

The concentrations able of inhibiting 50% of the mycelium growth (IC₅₀) were calculated graphically by the linear regression of plotted graphs.

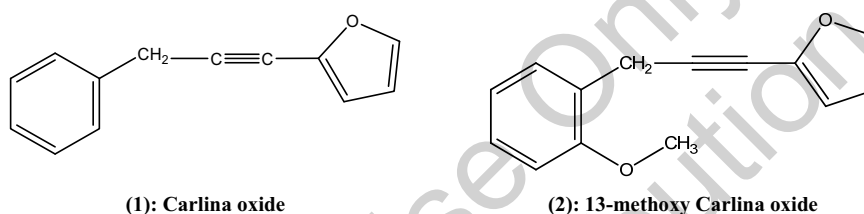
2.8. Fumigation Toxicity of Essential Oil and Carlina Oxide Against *Bactrocera oleae*

The fumigation with the extracts was carried out in hermetic and transparent plastic boxes with a capacity of 1 L, as an exposure chamber to test the toxicity of extracts against *B. oleae* adults. Three concentrations (*viz.*, 20, 30 and 50 µL) of the essential oil and Carlina oxide, without using any solvent were spread on Wathman type filter paper and attached to

Table 2. Chemical composition of Essential (EO) Oil and Hydrosol Extract (HE) of *C. caeruleus* roots.

No. ^a	Components	Lit/RI ^b	RI ^c	RI ^d	Essential Oils			HY	Identification ^e
					10 Samples				
					Coll EO	Min	Max		
1	Carlina Oxide	-	1580	2380	85.2	83.2	92.3	58.6	RI. MS. NMR
2	13-Methoxy Carlina Oxide	1798	1800	2104	5.3	2.1	6.5	11.6	RI. MS
3	Phytone	1844	1846	2131	-	-	-	23.2	RI. MS
4	Neophytadiene	1840	1851	1922	-	-	-	0.2	RI. MS
5	Hexadecanoic Acid	1942	2005	1944	5.3	3.2	5.8	2.5	RI. MS
% d ^e identification		-			95.8	-	-	96.1	-

^aOrder of elution is given on apolar column (Rtx-1). ^bRetention indices of literature on the apolar column (RILit). ^cRetention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^dRetention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp). ^eRI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode. Coll EO: collective essential oil. Min: minimum. Max: Maximum.

**Fig. (1).** The main components isolated of root essential oil from *C. caeruleus*.

the sub-surface of lids. The control set received no extracts. The boxes were screwed tightly containing 10 insects of the same age. Mortality was done by censusing dead insects for 24 hours from commencement of exposure.

The percentage of insect mortality was calculated using the Abbott correction formula [18].

$$\text{Corrected mortality} = (\text{OMT} - \text{OMC}) / (100 - \text{CM}) \times 100$$

where OMT: Observed Mortality in Treatment; OMC: Observed Mortality in Control; CM: Control Mortality.

$$\text{Percentage mortality} = (\text{Number of dead larvae} / \text{Number of larvae introduced}) \times 100$$

2.9. Statistical Analysis

The results were expressed as mean \pm SD and analyzed by SAS software, and for the determination of the significance levels ($n = 3$), the values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. Analysis of each test was performed in triplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical Composition of Essential Oil and Hydrosol Extract

The *C. caeruleus* samples were collected from ten locations of Tlemcen province, Algeria. Significant variations observed yields of essential oils depending on the locality of harvest (Table 1). The highest yields (1.1-2.6%) were observed in areas at high altitudes (S1-4, S6, S8 and S10), while the lowest yields (0.06-0.09%) were observed in areas at low altitudes (S4, S7- 8) (Table 1).

Routine GC-RI and GC-MS analysis of 10 samples of root essential oils led to the identification of 3 components. In particular, our spectral libraries were found to be non-operative in identifying the major components of the essential oil and hydrosol extract (No. 1 and 2 of Table 2).

Its identifications necessitated the implementation of complementary analyzes integrating ¹H and ¹³C NMR. Collective Essential (Coll EO) was subjected to column chromatography successive on silica gel, eluted with i) hexane to give compound (1) and ii) hexane/EtOAc (3:1) to give compound (2). Careful research in the literature confirmed our structures proposal. Indeed, the comparison of ¹H and ¹³C NMR data in our compounds with those described in the literature [6, 19] led to the unambiguous identification of benzyl-2-furylacetylene, known as Carlina oxide (1) and 13-methoxy carline oxide (2). Fig. (1) shows the two compounds identified in *C. caeruleus* essential oil.

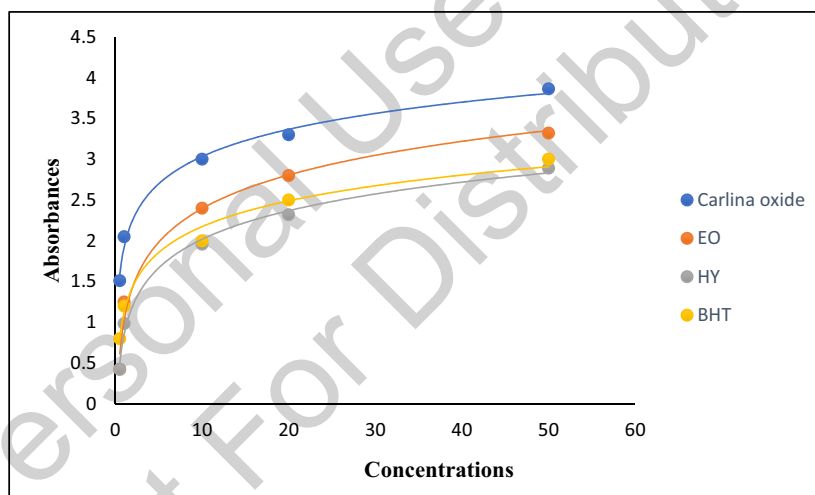
Hydrosol extract obtained with a yield of 1.9% was also analyzed by GC-IR and GC-MS. Five components representing 96.1% of the total composition of the extract were identified (Table 2). The hydrosol extract was also mainly represented by acetylenic compounds (70.2%) such as carlina oxide (58.6%) and 13-methoxy carline oxide (11.6%), followed by an appreciable amount of phytone (23.2%) and hexadecanoic acid (2.5%) (Table 2).

Carlina oxide was isolated for the first time in 1889 [6] and has been reported in the Asteraceae family and in particular, has been isolated in the essential oils of *Carlina acanthifolia*, *Carlinae radix* and *Carlina acaulis* [6, 16]. While 13-methoxy Carlina oxide was isolated in 1981 from the roots of *Carlina diae* [19]. In this study, we have

Table 3: % inhibition of DPPH^{*} of *C. caeruleus* essential oil hydrosol extract carlina oxide and BHT at different concentrations.

Samples	Antioxidant Activity						
	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50	
Essential Oil	DPPH Radical scavenging activity [%]	25.5 ± 2.7	30.2 ± 1.6	36.1 ± 2.9	50.3 ± 3.6	60.7 ± 3.8	-
	IC ₅₀ (mL/L)	-					24.6
	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50	-
Hydrosol Extract	DPPH Radical scavenging activity [%]	20.5 ± 2.1	35.2 ± 4.7	39.3 ± 3.2	46.3 ± 4.2	50.3 ± 6.6	-
	IC ₅₀ (mL/L)	-					46.2
	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50	-
Carlina Oxide	DPPH Radical scavenging activity [%]	46.1 ± 8.2	53.6 ± 7.6	67.9 ± 6.7	89.6 ± 9.3	94.3 ± 8.1	-
	IC ₅₀ (mL/L)	-					6.2
	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50	-
BHT	DPPH Radical scavenging activity [%]	18.6 ± 0.8	30.4 ± 1.6	35.9 ± 2.8	55.9 ± 6.3	84.7 ± 9.3	-
	IC ₅₀ (mL/L)	-					16.4
	Concentration (mL/L)	2.5	5	10	25	50	-

Sample and positive control were done in triplicates (n=3)

**Fig. (2).** Reducing power activities of *C. caeruleus* Essential Oil (EO), hydrosol extract (HY) and carlina oxide.

reported for the first time the chemical composition of the essential oil and hydrosol extract of this plant, which appears as an interesting source of acetylenic compounds.

3.2. Antioxidant Activity of *C. caeruleus* Essential Oil, Hydrosol Extract and its Major Component Carlina Oxide

The antioxidant activities were performed using the free radical scavenging activity (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) tests, using BHT as a positive control. The comparison of the DPPH^{*} scavenging activity of *C. caeruleus* essential oil, hydrosol extract and Carlina oxide with that expressed by the BHT showed very good antioxidant activity compared to the synthetic compound BHT. The lowest free radical scavenging activities were obtained by hydrosol extract (50.3%) and essential oil (60.7%), while the

strongest activity was obtained by Carlina oxide (94.3%) at a concentration of 50 mL/L (Table 3). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) providing 50% inhibition of DPPH in the test solution was calculated (see Table 3). Carlina oxide indicated the highest activity in quenching of DPPH radical, with an IC₅₀ of 6.2 mL/L, which is about 3 times higher than the synthetic antioxidant used as a reference (IC₅₀ = 16.4 mL/L; Table 3).

Fig. (2) represents the absorbance values as a function of the different concentrations of essential oil, hydrosol extract and Carlina oxide obtained by FRAP method. Antioxidant activity of extracts was found to increase with increasing concentration. At higher concentrations, the antioxidant activity of Carlina oxide was higher than essential oil, BHT and hydrosol extract (Fig. 2).

Table 4. *In-vitro* antifungal activity against phytopathogenic fungi.

Microorganisms	IC ₅₀ (mg/L)		
	Essential Oil	Hydrosol Extract	Carlina Oxide
<i>P. expansum</i>	20 ± 3.2	> 100	15 ± 2.3
<i>A. niger</i>	77.8 ± 6.8	> 100	56.8 ± 10.7
<i>Trichoderma sp.</i>	20 ± 0.97	> 100	13 ± 0.31
<i>A. flavus</i>	20 ± 2.7	> 100	16 ± 0.78
<i>R. oryzae</i>	> 100	> 100	> 100

Sample and positive control were done in triplicates (n=3).

Table 5. Protection effect of hydrosol extract and carlina oxide against apple infection caused by *P. expansum*.

Days ^a	PDI ^c (%)		
	Positive Control ^b	Carlina Oxide (0.01 mg/L air)	Essential Oil (0.01 mg/L air)
1 st day	00 ^a	00 ^a	00 ^a
3 rd day	24.7 ^b	12.8 ^b	16.8 ^a
6 th day	50.6 ^c	18.9 ^b	45.5 ^b
9 th day	100 ^d	25.8 ^c	64.8 ^c
15 th day	100 ^d	33.2 ^c	80.4 ^d

^a Days of storage. ^b Positive control. ^c Percent Disease Index (PID). The means in a column followed by the same letter (s) represent values that are not significantly different ($P \leq 0.05$).

In the present study, all extracts studied showed antioxidant activity to able to reduce the stable free radical DPPH to the yellow colored diphenyl-picrylhydrazine. Carlina oxide showed a strong antioxidant activity compared to the synthetic antioxidant BHT. On the other hand, the results showed that essential oil and hydrosol extract presented lower antioxidant activity compared to Carlina oxide and BHT when looking to its values. However, it seems that the combination of Carlina oxide with hexadecanoic acid and 13-methoxy Carlina decreases the antioxidant activity. On the other hand, according to the literature, Polyacetylenes act as a kind of anti-inflammatory and antioxidant. These compounds would slow down the development of cancer cells in humans, preventing their multiplication [20].

3.3. Antifungal Activity

3.3.1. *In Vitro* Tests of the Essential Oil, Hydrosol Extract and Carlina Oxide Against Plant Fungi

The effects of hydrosol extract, essential oil and Carlina oxide were evaluated against fungal phytopathogens: *P. expansum*, *A. niger*, *Trichoderma sp.*, *A. flavus* and *R. oryzae* (Table 4). The tests showed the variability of inhibition according to the pathogenic fungi tested. The strains *P. expansum*, *Trichoderma sp.*, and *A. flavus* are more sensitive to Carlina oxide and essential oil than those of *A. niger* and *R. oryzae*. The approach of concentrations causing 50% inhibition of mycelial growth (IC₅₀) showed that Carlina oxide

and essential oil have the strongest activity against fungi. The higher activity was observed by Carlina oxide against *Trichoderma sp.*, *P. expansum* and *A. flavus* with IC₅₀s of 13, 15 and 16 mg/L, whereas, *A. niger* (56.8 mg/L) and *A. oryzae* (> 100 mg/L) appear to be fewer sensitive strains. The results also indicate that the inhibition of the mycelial growth of *Trichoderma sp.*, *P. expansum* and *A. flavus* was significantly influenced by essential oil with IC₅₀ values of 20 mg/L, respectively. Hydrosol extract of *C. caeruleus* was the less active, the IC₅₀s were more than 100 mg/L for all strains (Table 4).

3.3.2. *In Vivo* Protection Effect of Essential Oil and Carlina Oxide Against Apple Infection Caused by *P. expansum*

Given the good results obtained of *in-vitro* antifungal activity, the *in-vivo* fungicidal activity of Carlina oxide and essential oil on the disease development of *P. expansum* infected apple was tested. *In-vivo* activity showed that the severity of the disease caused by *P. expansum* was significantly reduced ($P \leq 0.05$) by Carlina oxide. Used with the lowest concentration (0.01 mg/L air). Carlina oxide showed a very interesting protective effect on the apples with a small percentage disease index (33%) until the 15th storage day against rot caused by *P. expansum* (Table 5).

According to Fig. (3a), treatment of *P. expansum* infected apple with Carlina oxide had a significant protective



Fig. (3). Apples treated with carlina oxide (a), Apples treated with essential oil (b) and control positive (Without treatment) (c) on the infection caused by *P. expansum* after 15 days of storage at 25 ± 1 °C.

effect on reducing the severity of the disease up to 15 days of storage at 25 °C. The essential oil was no effective against rot caused by *P. expansum*, the percent disease index was 80% (Fig. 3b). While percentage disease index was 100% for untreated fruit used as controls (Fig 3c).

Carlina oxide showed effective in *in-vitro* and *in-vivo* antifungal activities. No information on the *in-vivo* properties of this molecule is available in the literature. Herrmann *et al.* [21], studied antifungal activity of Carlina oxide isolated to *Carlina acaulis* against *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and *Candida glabrata*. These researchers showed that Carlina oxide has high antimicrobial activity, even against multidrug-resistant strains and clinical isolates [22].

3.4. Fumigation Toxicity

The results of fumigation toxicity *C. caeruleus* essential oil besides Carlina oxide against adults of *B. oleae* are summarized in Table 6. The essential oil of *C. caeruleus* proved to be very biocidal toward adults of *B. oleae*, mortality of 100% of the population is noted with a dose of 50 $\mu\text{L/L}$ air after 24 hours of exposure (Table 6). However, Carlina oxide caused mortality over 70%. The fumigation toxicity demonstrated the relative potential of root essential oil and Carlina

oxide of *C. caeruleus* as natural insecticides against *B. oleae*. From a comparative point of view, the essential oil produces a better insecticidal activity than Carlina oxide. The insecticidal properties of essential oil may be related to the presence of high concentrations of Carlina oxide or to a synergistic effect with the other components oil. Many polyacetylenes have been found in species of the Asteraceae family and studied for their insecticidal activities [17], while, Carlina oxide was received insufficient study for its biological activities.

Table 6. Fumigant toxicity of essential oil and carlina oxide against *B. oleae* after 24h of exposure.

Concentrations ($\mu\text{L/L}$ air)	% of Mortality	
	<i>C. caeruleus</i>	Carlina Oxide
20	26.7 ± 1.2^a	16.6 ± 1.2
30	56.8 ± 5.1^b	46.6 ± 2.1
50	100 ± 00^c	73.2 ± 4.3

CONCLUSION

In conclusion, we aimed as part of our program to evaluate antioxidant, antifungal and insecticidal activities of *C. caeruleus* extracts, in hopes to find new natural products. The results showed that plant is a good source of acetylene derivatives. Carlina oxide from roots of *C. caeruleus* presented high antioxidant and antifungal properties, while essential oil had better insecticidal activity. Furthermore, Carlina oxide has demonstrated promising *in-vivo* antifungal activity to control infection of apples by *P. expansum*. Hydrosol extract and essential oil presented low antioxidant and antifungal activities compared to Carlina oxide. This decrease in activity can be due to the association of non-active compounds such as phytoene and hexadecanoic acid. These promising activities make it possible to consider the use of Carlina oxide as a natural food preservative and fungicidal to enhance human health. In any case, further studies need to be conducted to evaluate the efficacy of Carlina oxide in industrial scale.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals/humans were used for studies that are the basis of this research.

RESEARCH INVOLVING PLANTS

The plants species is not endangered or extinct.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Ministère des Affaires Étrangères et Européennes throughout the 'Partenariat Hubert Curien Tassili' research program.

REFERENCES

[1] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.*, **1995**, *28*(1), 25-30.

[2] Xu, W.; Zhang, F.; Luo, Y.; Ma, L.; Kou, X.; Huang, K. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 217-222.

[3] Fang, X.; Li, Z.; Wang, H.; Zhang, X. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. *J. Appl. Microbiol.*, **2011**, *111*(1), 145-154.

[4] Boullard, B. *Plantes médicinales du monde: réalités & croyances*. Estem: Paris; **2001**, 515-516.

[5] Mihoub, I.; Robert, T.; Ghashghaie, J.; Vilatersana, R.; Lamy, F.; Benmrid, R.; Lamothe-Sibold, M.; Aid, F. Phylogenetic position of two endemic *Carthamus* species in Algeria and their potential as sources of genes for water use efficiency improvement of safflower. *J. Syst. Evo.*, **2017**, *55*(1), 34-43.

[6] Djordjevic, S.; Petrovic, S.; Ristic, M.; Djokovic, D. Composition of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Chem. Nat. Comp.*, **2005**, *44*(4), 410-412.

[7] Saffidine, K.; Sahli, F.; Zerroug, M. Antimicrobial activity of an Algerian medicinal plant: *Carthamus caeruleus* L. *Pharmacogn. Commun.*, **2013**, *3*(4), 71-76.

[8] Belabbes, R.; Dib, M.E.A.; Djabou, N.; Ilias, F.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from western Algeria. *Chem. Biodivers.*, **2017**, *14*, e1600482.

[9] Dib, M.A.; Paolini, J.; Bendahou, M.; Varesi, L.; Allali, H.; Desjobert, J.M.; Tabti, B.; Costa, J. Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *arbutus unedo* and *in vitro* antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Nat. Prod. Commun.*, **2010**, *5*(7), 1085-1090.

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

[11] National Institute of Standards and Technology. NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT. **1999**.

[12] Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jap. J. Nutri. Dietet.*, **1986**, *44*, 307-315.

[13] Barnett, H.L.; Hunter B.B. Illustrated genera of imperfect fungi, 4th Ed.; The American Phytopathological Society: St. Paul, Minnesota(USA), **2006**.

[14] Samson, R.A.; Hoekstra, E.S. Frisvad, J.C. Introduction to food and airborne fungi, 7th Ed.; Centraalbureau voor Schimmel cultures: Utrecht, Netherlands. **2001**.

[15] Singh, P.; Srivastava, B.; Kumar, R.; Dubey, N.; Gupta, R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oils as a plant based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Sci. Food. Chem.*, **2008**, *88*, 2421-2425.

[16] Pandey, D.; Tripathi, N.; Tripathi, R.; Dixit, S.N. Fungi-toxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *J. Plant Dis. Prot.*, **1982**, *89*, 344-349.

[17] Tian, J.; Zeng, X.; Lu, A.; Zhu, A.; Peng, X.; Wang, Y. Perillaldehyde, a potential preservative agent in foods: Assessment of antifungal activity against microbial spoilage of cherry tomatoes. *LWT Food Sci. Technol.*, **2015**, *60*, 63-70.

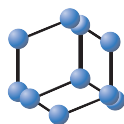
[18] Abbott, W.S. A Method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **1925**, *18*, 265-267.

[19] Bohlmann, F.; Schuster, A.; Meusel, H. A carlina oxide derivative from *Carlina diae*. *Phytochemistry*, **1981**, *20*(4), 833-824.

[20] Kononov, D.A. Polyacetylene compounds of plants of the Asteraceae family (review). *Pharm. Chem. J.*, **2014**, *48*(9), 36-53.

[21] Herrmann, F.; Hamoud, R.; Sporer, F.; Tahrani, A.; Wink, M. Carlina Oxide - A natural polyacetylene from *Carlina acaulis* (Asteraceae) with potent antitypanosomal and antimicrobial properties. *Planta Med.*, **2011**, *77*, 1905-1911.

[22] Djordjevic, S.; Petrovic, S.; Ristic, M.; Djokovic-Milenkovic, M.; Vucicevic, D.; Zizic, S.; Kucic, J. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *109*, 458-463.



Efficacy of Essential Oil and Hydrosol Extract of *Marrubium vulgare* on Fungi Responsible for Apples Rot



Amina Tabet Zatla^{1,*}, Imane Mami¹, Mohammed El Amine Dib² and Mohammed El Amine Sifi³

¹Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Université de Tlemcen, Tlemcen, Algérie;

²Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, Tlemcen, Algérie; ³Laboratoire de Toxicologie, Faculté des Sciences de la Nature, de la Vie, et des Sciences de la Terre et l'Univers, Université de Tlemcen, Tlemcen, Algérie

Abstract: Background: The microorganisms such as *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* are well-known pathogens in apples during postharvest. So, to protect apples from these pathogens, chemical control methods were exercised.

Introduction: The main objective of this work was to study the chemical composition and the *in-vitro* and *in-vivo* antifungal properties of essential oil and hydrosol extract of *Marrubium vulgare*.

Methods: In this work, the air-dried aerial parts of *Marrubium vulgare* were hydrodistilled in a Clevenger-type apparatus. The essential oil and hydrosol extract isolated were analyzed using Gas Chromatography (GC) and Mass Spectrometry (GC/MS). The *in-vitro* antifungal activity of the both extracts was investigated against *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Alternaria alternata* fungi using radial growth technique. The effect of the essential oil and hydrosol extract on disease development of apple caused by *Penicillium expansum* in the *in-vivo* conditions was assessed.

Results: The essential oil of *Marrubium vulgare* was characterized principally by E-β-caryophyllene (23.5%), E-β-farnesene (21%), α-humulene (14.8%), β-bisabolene (11.1%), caryophyllene oxide (6.8%) and phytol (3.1%). While, the methyl-eugenol (65.5%), α-Bisabolol (12.5%), linalool (6.5%) and caryophyllene oxide (6.2%) were the major compounds of hydrosol extract. The result of *in-vitro* antifungal activity of hydrosol extract showed an interesting antifungal inhibition against *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Alternaria alternata* with percentage inhibition ranging from 77% to 89% at low concentration of 0.15 mL/L. The essential oil was found to inhibit the growth of *Penicillium expansum* in a dose-dependent manner, with a percentage inhibition of 100% at 30 mL/L. Furthermore, essential oil and hydrosol extract have demonstrated promising *in-vivo* antifungal activity to control infection of apples by *Penicillium expansum* up to 25th day of storage, compared with the control.

Conclusion: The preventive and protective effects of essential oil and hydrosol extract could be exploited as an ideal alternative to synthetic fungicides for using the protection of stored apples from fungal phytopathogens.

Keywords: *Marrubium vulgare*, essential oil, hydrosol extract, protective agents, *Penicillium expansum*, apples.

1. INTRODUCTION

Apple (*Malus domestica*) is a widely grown fruit in temperate zones with a concentration in the northern hemisphere. Conservation diseases are a major cause of apple after they have been stored in cold rooms in particular by infection of *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum* [1-3].

To effectively control apple diseases, chemical control methods have been used. Among these methods, many synthetic fungicides have been used. Even with low exposure, chemical pesticides can have serious consequences on our health. They come into contact with our body through the skin, eyes, inhalation or ingestion. They can cause diseases such as cancer and have an impact on the environment, etc. [4-12]. On the other hand, fungi have developed a resistance against the fungicides, due to extensive and indiscriminate use of these various chemical groups, that are the basic tools for the management of microbial infections [13].

The antifungal activity of essential oils and their isolated components was well documented [14]. Recently, the use of

*Address correspondence to this author at the Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail: amina_tabet18@yahoo.ca

plant essential oils has been suggested as an alternative to synthetic fungicides in the management of fruit rot fungi during postharvest handling [15]. Many studies have been conducted to demonstrate the potential of volatile compounds and in the control of rot of stored fruits. For instance, the activity of eugenol in apples was evaluated against *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. expansum* and *P. vagabunda* [16]. While carvacrol has shown high inhibition of mycelial growth of *Neofabraea alba* on apples [17]. Another study suggests that essential oil from *Asteriscus graveolens* has fungicidal properties against postharvest phytopathogenic fungi in apples [18].

M. vulgare belongs to the family Lamiaceae represented to about thirty different species, distributed in various regions, France, Pakistan, Brazil, Tunisia, Algeria and Morocco. In traditional medicine, this species is used for the treatment of acute and chronic bronchitis, pulmonary catarrh, respiratory infections, tuberculosis and asthma [19, 20]. The chemical composition of the essential oils of *M. vulgare* has been widely studied; according to geographical and botanical origins of samples [21-27]. However, no study reported the chemical composition and biological activities of hydrosol extract from this species.

To our knowledge, no studies have been conducted to use *M. vulgare* essential oil and hydrosol extract against apple fungi. Therefore, the objective of this study was to study the chemical composition *M. vulgare* native to western Algeria and the *in-vitro* and *in-vivo* antifungal activities of essential oil and hydrosol extract.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

Aerial parts of *M. vulgare* were collected from Beni-Snous region, west of Algeria [34°38'35"N; 1°33'41"O] during March 2018. The aerial parts of *M. vulgare* were identified and confirmed by the Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of the University of Tlemcen (Algeria). Voucher specimen (AD. MV.05.14.01) was deposited in the herbarium of the University of Tlemcen.

2.2. Essential Oil and Hydrosol Extract Isolation

The essential oil of dry aerial parts of *M. vulgare* was obtained by hydrodistillation using a cleverger type apparatus during 5h. A pale-yellow essential oil with a yield of 0.3% was obtained. The hydrosol extract was obtained by recovering the first liter of hydro-distillate during distillation. 500 ml of this hydro-distillate was washed with 200 ml of diethyl ether, then the organic layer was separated, evaporated and dried over Na₂SO₄, giving yellow oil with a yield of 0.2%. The remaining 500 mL of hydrosol remaining were used to study *in-vivo* activity.

2.3. Analysis Conditions

Gas Chromatography (GC) is a device of the Hewlett Packard 6890 type, equipped with an HP5 capillary column (5% phenyl and 95% methylpolysiloxane) of 30 m length and 0.25 mm internal diameter and the film thickness of the stationary phase which is 0.25 µm. The analytical conditions were as follows: The carrier gas which constitutes the mobile

phase was Helium set at a flow rate of 0.8 min⁻¹. The programming of the temperature was as follows: the temperature of the injector was 240°C, temperature detectors of 300°C; temperature program from 60 to 240 at 3°C min⁻¹ and the injection was done in split mode (1:20). 0.4 µL of pure essential oil and 1 µL of hydrosol extract. To determine Retention Indices (RI), a series of n-alkanes (C₅-C₂₈) mixture was analyzed under the same operative conditions on HP-5 columns and the sample indices were calculated.

The GC coupled to a Hewlett Packard 5973A type mass Spectrometer (SM), equipped with an apolar capillary column HP5MS, 30 m × 0.25 mm, phase thickness: 0.25 µm with electronic impact (ionization current, 70 eV) scan detector was used. The carrier gas was helium with a flow rate of 0.7 mL min⁻¹; source pressure of 10.7 mbar, interface temperature of 240°C; injection, 250°C; programming of the oven: 3°C.min⁻¹ from 60 to 240°C, with 8 min isothermal at 60°C and 15 min isothermal at 240°C; 0.1 µL of essential oil and 1 µL of hydrosol extract was injected in split mode 1:20.

The identification of the components was based on: (i) the comparison of their retention indices (RI GC) on apolar columns, determined with respect to the retention time of a series of n-alkanes with a linear interpolation, with the composites authentic or literature data [28] and (ii) on the computer corresponding to commercial mass spectral libraries [29].

2.4. Antifungal Activities

2.4.1. Pathogenic Fungal Strains

Three fungal species have been isolated from rotten apples, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. The fungal species were placed in 9 cm Petri dishes sterilized with a quantity of lactic acid (20%) in order to stop the growth of fungi. The fungal species were identified using fungal systematics based on their macroscopic cultural characteristics and morphology observed under a microscope [30, 31]. The spores were obtained from the surface of the agar and suspended in 5 mL of sterile distilled water containing 0.1% v/v Tween 80. Spore suspensions were filtered through four layers of sterile cheesecloth to remove mycelial fragments. In parallel, an inoculum was prepared and quantified at 1x10⁶ spores / mL using a hemacytometer (Bio-Rad's TC20), Cellometer Vision, as previously reported [32].

2.4.2. In-vitro Antifungal Assay

In order to test the *in-vitro* antifungal activity of the essential oil and hydrosol extract, we used the method of direct contact or radial growth a previously published [33-35]. A quantity of the extract was solubilized in 2 mL of DMSO, volumes of 10 and 30 mL/L were added to 10 mL of PDA at 45°C in a test tube, after stirring the contents of the tubes was poured into a petri dish of 9 cm in diameter. The inoculation was done by depositing in the center of the box of a disk of the mycelium of about 0.5 cm of diameter of a young culture of 5 to 7 days. A petri dish containing 10 mL of PDA without extracts was inoculated to serve as a control. After incubation at 27°C for 2 to 7 days taking into account the growth of the control, the percentage of mycelial growth inhibition was calculated from the formula [35, 36]:

$$I\% = (DC - DT/DC) \times 100$$

where DC is the diameter of the mycelial growth of the negative control, DT is the average diameters of fungal colony of treatment.

2.4.3. In-vivo Antifungal Assay

For this test, three similar apples in size, maturity, appearance and no physical defects were selected. Apples were surface-sterilized using a 70% ethanol solution for 2 min and rinsed with distilled water (10 min each) and air-dried. A sterile toothpick was inserted to a depth of approximately 0.3 cm, and the wounded sites were inoculated with a droplet of the *P. expansum* conidial suspension at a concentration of 10^6 spores/mL [35]. For protective effect, we introduced a polystyrene box (1 L), a filter paper disc 4 cm in diameter impregnated with a volume of 0.02 mL of essential oil, deposited on a petri dish.

In order to not to distort the taste and odor of the fruits, only a single concentration of hydrosol extract (0.15 mL/L) was tested. The apples were immersed directly in the hydrosol for 5 min and placed in a polystyrene container. All well-closed container was then stored at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ for 25 days under a pressure of 692 mmHg and humidity of 60%.

Concerning preventive activity, the same treatment previously described with (0.02 mL/L air) essential oil and (0.15 mL/L) hydrosol extract, but without inoculation. The untreated controls were prepared under the same conditions with filter paper disk impregnated with distilled water. All experiments were repeated three times to determine the averages of the experimental results. The percentage disease index of infection on the apple fruits was determined using the formula:

$$DI (\%) = \text{TNI} / N \times 100$$

where = TNI: Total number of infected apple fruits and N = total number of apple fruits Assessed [35, 36].

2.5. Taste Panel

The sensory analysis was carried according to the method described previously [35] and based on evaluation of taste and odor of apples exposed to the essential oil (0,01 ml / L of air) and washed with of hydrosol (0.15 mL / L).

The jury members were chosen from the students and staff of our laboratory. A scale of 5 to 1 has been established, where 1 = do not like much, 2 = do not like, 3 = do not like and do not like, 4 = like; 5 = strongly similar. A general taste score was calculated as the average of all grades given by twenty panellists.

2.6. Statistical Analysis

All assays were replicated thrice for each treatment with three different sample preparations. Experimental data were analyzed by using SAS v. 9.1.3 program. All values were expressed as means \pm standard deviations ($n=3$), and means were compared by Duncan's multiple range test at 5% level of confidence, following one-way ANOVA.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical Composition of Essential and Hydrosol Extract

The chemical composition of essential oil and hydrosol extract was represented in Table 1. The chemical components of essential oil and hydrosol extract isolated from the aerial parts of *M. vulgare* were analyzed by GC and GC-MS. 32 compounds which accounted for 92.2% of the total oil were identified. The main components were E- β -caryophyllene (23.5%), E- β -farnesene (21%), α -humulene (14.8%), followed by β -bisabolene (11.1%), caryophyllene oxide (6.8%) and phytol (3.1%) (Table 1).

The chemical compositions of *M. vulgare* essential oil from various origins have been the subject of many studies. The literature reveals the occurrence of several chemotypes. From Lithuania, (Z)- β -farnesene, β -caryophyllene, (E)-2-hexenal, α -humulene and germacrene D were the main components of *M. vulgare* essential oil [37]. From Czech Republic, the main constituents of *M. vulgare* essential oil were β -caryophyllene and germacrene D [24]. From the different regions of Iran, the main components were β -bisabolene, β -caryophyllene, germacrene D and E- β -farnesene [22]. From Egypt, the main constituents of *M. vulgare* essential oil were tricyclene, β -pinene, bisabolol, β -elemone and isomenthon-8-thiol [38]. From the different regions of Tunisia, the main compounds of *M. vulgare* were eudesmol, β -citronellol, citronellyl formate and germacrene D [39]. From the different regions of Algeria, the main constituents of *M. vulgare* were 4,8,12,16-tetramethyl heptadecan-4-ol, germacrene D-4-ol, α -pinene, phytol, dehydro-sabina ketone, piperitone, δ -cadinene, 1-octen-3-ol, Benzaldehyde, eugenol and β -bisabolene [40,41]. However, *M. vulgare* essential oil from west Algerian was distinguished by the occurrence of E- β -caryophyllene, E- β -farnesene, α -humulene and β -bisabolene.

Conversely, the analysis of hydrosol extract obtained by liquid-liquid extraction showed a total of eleven components accounting to 95.2% of the total extract composition (Table 1). The main characteristic of the hydrosol extracts was the presence of oxygenated monoterpenes (72%) such as methyl eugenol (65.5%), α -bisabolol (12.5%), linalool (6.5%) and caryophyllene oxide (6.2%) (Table 1).

On the other hand, we can observe quantitative and qualitative differences between essential oil and hydrosol extract differed concerning the classes of compounds and their main components. The GC-MS analyses of hydrosol extract showed only oxygenated compounds; no hydrocarbons were noted. Hydrosol extract revealed the occurrence of 11 compounds. Methyl eugenol was present in a large proportion in the hydrosol extract, while, it was in low proportion in essential oil. In addition, hexanal, (E)-2-hexenal, octen-3-one and 1-octen-3-ol were found in the hydrosol extract, while, it was absent in the composition of the essential oil.

3.2. In-vitro Test of the Essential Oil and Hydrosol Extract Against Plant Fungi

The effect of essential oil and hydrosol extract was evaluated against three fungal phytopathogens (Table 2). Our results indicated that the activity of essential oil varied with its concentration. Essential oil significantly inhibited fungal

Table 1. Chemical composition of essential oil and hydrosol extracts of *M. vulgare*.

S. No.	Components	RI	EO	HY	Identification
1	Hexanal	762	-	0.1 ± 0.01	RI,SM
2	(E)-2-Hexenal	820	-	0.5 ± 0.2	RI,SM
3	Octen-3-one	936	-	1.2 ± 0.3	RI,SM
4	1-Octen-3-ol	959	-	1.5 ± 0.1	RI,SM
5	Myrcene	981	0.1 ± 0.01	-	RI,SM
6	β-Ocimene	1027	0.2 ± 0.01	-	RI,SM
7	Nonanal	1102	0.1 ± 0.01	-	RI,SM
8	Linalool	1104	0.2 ± 0.01	6.5 ± 1.2	RI,SM
9	α-Thujone	1104	0.1 ± 0.01	-	RI,SM
10	Decanal	1195	0.2 ± 0.01	-	RI,SM
11	Theaspirane A	1293	2.0 ± 0.2	-	RI,SM
12	Undecanal	1308	0.1 ± 0.01	-	RI,SM
13	(Z)-β-Damascenone	1352	0.1 ± 0.01	-	RI,SM
14	α-Copaene	1379	1.8 ± 0.3	-	RI,SM
15	Bourbonene	1385	0.5 ± 0.1	-	RI,SM
16	Methyl eugenol	1395	tr	65.5 ± 1.6	RI,SM
17	Tetradecane	1400	0.6 ± 0.01	-	RI,SM
18	E-β-Caryophyllene	1413	23.5 ± 0.4	-	RI,SM
19	β-Copaene	1433	0.3 ± 0.02	-	RI,SM
20	Trans-α-Bergamotene	1439	0.1 ± 0.01	-	RI,SM
21	E-β-Farnesene	1459	21.0 ± 0.6	-	RI,SM
22	α-Humulene	1477	14.8 ± 0.8	-	RI,SM
23	Germacrene-D	1480	1.4 ± 0.3	-	RI,SM
24	α-Curcumene	1483	1.1 ± 0.2	-	RI,SM
25	Trans-β-ionone	1490	0.1 ± 0.02	-	RI,SM
26	Bicyclogermacrene	1505	0.2 ± 0.01	-	RI,SM
27	β-Bisabolene	1500	11.1 ± 0.2	-	RI,SM
28	Caryophyllene oxide	1613	6.8 ± 0.5	6.2 ± 0.9	RI,SM
29	τ-Muurolol	1640	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.01	RI,SM
30	α-Cadinol	1663	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	RI,SM
31	α-Bisabolol	1682	0.3 ± 0.1	12.5 ± 1.3	RI,SM
32	Heptadecane	1700	0.4 ± 0.1	-	RI,SM
33	Nonadecane	1900	0.1 ± 0.01	-	RI,SM
34	Eicosane	2100	0.4 ± 0.06	-	RI,SM
35	Phytol	2098	3.1 ± 0.3	0.5 ± 0.1	RI,SM
36	Tricosane	2300	0.4 ± 0.2	-	RI,SM
% Identification			92.2	95.2	-
Monoterpene hydrocarbons			2.3	-	-
Oxygenated monoterpenes			0.4	72.0	-
Sesquiterpene hydrocarbons			75.9	-	-
Oxygenated sesquiterpenes			8.2	19.4	-
Oxygenated diterpenes			3.1	0.5	-
Non-terpenic compounds			2.3	3.3	-
RI: Retention indices; (EO): Essential oil; (HY) Hydrosol extract.					

Table 2. Antifungal activity of Essential Oil (EO) and hydrosol extract (HY) against phytopathogenic strains.

Tested Microorganisms	Percentage of Inhibition			
	Essential Oil			Hydrosol Extract
(mL/L)	10	20	30	0.15
<i>B. cinerea</i>	58.1 ± 2.5 ^a	89.8 ± 1.7 ^a	97.7 ± 1.3 ^a	85.6 ± 1.5 ^a
<i>A. alternata</i>	47.9 ± 2.4 ^b	87.6 ± 1.4 ^a	96.4 ± 3.2 ^a	77.3 ± 2.5 ^b
<i>P. expansum</i>	93.3 ± 3.5 ^c	95.5 ± 2.3 ^b	100 ± 0 ^a	89.8 ± 2.6 ^a

^{a-c} Values are mean (n = 3) ± standard deviations. Values followed by the same letter in each column are not significantly different in analysis of variance and Duncan's multiple range test (p < 0.05).

Table 3. Effect of essential oil of *M. vulgare* on the protective of apple fruits against the infection caused by *P. expansum*.

Days ^a	PDI ^d (%)					
	-	-	Essential Oil (0.02 ml/L)		Hydrosol Extract (0.15 ml/L)	
	Negative Control ^b	Positive Control ^c	Protective Effect	Preventive Effect	Protective Effect	Preventive Effect
1 th	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f
7 th	60 ± 5.6 ^f	80 ± 8.3 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f
10 th	80 ± 6.5 ^g	100 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f	0.0 ± 0.0 ^f
25 th	100 ± 0.0 ^h	100 ± 0.0 ^g	15 ± 1.6 ^g	0.0 ± 0.0 ^f	20 ± 4.5 ^g	15 ± 2.6 ^g

^a Days of storage. ^b Negative control: apple fruits were only sprayed with sterile distilled water. ^c Positive Control: apple fruits were inoculated with *P. expansum*. ^d Percentage disease index (PDI).

^{e-h} Values are mean (n = 3) ± standard deviations. Values followed by the same letter in each column are not significantly different in analysis of variance and Duncan's multiple range test (p < 0.05).

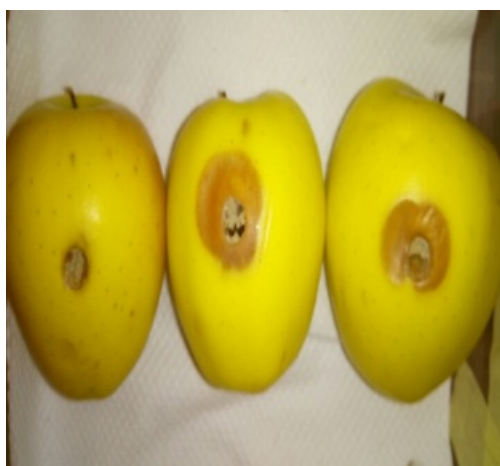
growth and exhibited a remarkable inhibitory activity on the three pathogenic agents tested with the inhibition percentage of more of 96% at the concentration of 30 mL/L. On the other hand, at low concentration of 0.15 mL/L, hydrosol extract exhibited a best *in-vitro* antifungal activity compared to oil with a percentage of inhibitions of 89.8%, 85.6% and 77.3% for *P. expansum*, *B. cinerea* and *A. alternata*, respectively (Table 2).

The results showed that essential oil and hydrosol extract from aerial parts of *M. vulgare* have very interesting *in-vitro* antifungal effects against the three pathogens. The antifungal properties of essential oil may be related to the presence of high concentrations of sesquiterpene hydrocarbon compounds (76.1%), such as E-β-farnesene, E-β-caryophyllene, α-humulene and β-bisabolene or to a synergistic effect with some active components. The β-caryophyllene is a compound found in spice blends, citrus flavors, soaps, detergents, creams and lotions, and also in a variety of food and beverage products [42, 43], is known for these biological activities such as antimicrobial [44, 45], local anesthetic [46], anti-carcinogenic [47, 48] and anti-inflammatory [49, 50]. In addition, Dahham *et al.* [51] reported that β-caryophyllene have a significantly inhibits the growth *S. aureus* strain. Other minor sesquiterpenes identified in our oil such as cadinene [52], caryophyllene oxide [53], spathulenol [54], α-bisabolol [55] and germacrene-D [56], are often quoted for their highest anti-inflammatory and antifungal activities.

3.3. *In-vivo* Protection Effect of Essential Oil and Hydrosol Extract Against Olive Infection Caused by *P. Expansum*

According to the results of *in-vitro* tests, essential oil and hydrosol extract from aerial parts of *M. vulgare* were chosen to determine preventive and protective effects in apple fruits against infection caused by *P. expansum*. The results were presented in Table 3. Unlike *in-vitro* activity, the *in-vivo* activity showed that disease severity caused by *P. expansum* was significantly (P ≤ 0.05) reduced by essential oil (Table 3). Essential oil used with the concentration of 0.02 mL/L air, showed a very interesting preventive (100%) and protective (80%) effect on apple up to twenty-fifth days against the gray mold caused by *P. expansum*, compared with control, which were completely damaged from the tenth days (Table 3). Hydrosol extract with a concentration of 0.15 mL/L showed preventive and protective effects of 100% up to 20 days and, 80% and 70% up to the 25th day, respectively (Table 3).

In the present investigation, the results demonstrated that both extracts of *M. vulgare* demonstrated a good effect against *P. expansum*, responsible to decay of apple fruits and to improve the efficacy of control of postharvest pathogens (Fig 1). This protective effect of essential oil and hydrosol extract was probably due to active components in extracts. According to these observations, we speculate that high antifungal activity of *M. vulgare* oil could be related to their



Apples treated with hydrosol



Apples treated with essential oil



Controls

Fig. (1). Protective effect of *M. vulgare* essential oil (EO) and hydrosol extract (HY) after twenty fifth days of storage at 24±1°C.

Table 4. Effect of essential oil and hydrosol extract on acceptability sensory scores of apple fruit stored at 24±1°C.

Treatment	Acceptability	Control
Hydrosol (0.15 mg/mL)	4.0	4.5
Essential oil (0.02 mL/mL)	3.9	

Notes: The results are expressed as the average of all grades. a 1 = strongly dislike. 2 = dislike. 3 = neither like nor dislike. 4 = like. 5 = strongly like.

sesquiterpenes components and/or could be related to synergism of their minor and major components. On the other hand, the antifungal potential of the hydrosol extract of *M. vulgare* may be probably attributed to the presence of methyl eugenol, which has been reported to possess antifungal activity [57-59], as well as a synergy between this compound and other one (α -bisabolol, linalool and caryophyllene oxide) that were already known to have antifungal effects [60, 61].

3.4. Evaluation Sensorial of Apple Fruit Stored

The results indicate that the majority of panelists did not report a significant sensorial difference between apple fruit samples treated with hydrosol and essential oil. Table 4

shows the acceptability scores of apple fruit that had a value of 4.0 for apple fruit treated by hydrosol extract and 4.5 for control (without hydrosol extract). While the one treated with essential oil was deemed acceptable, with a slight difference of taste (3.9).

CONCLUSION

The chemical composition of the essential oil indicated that this plant was a good source of sesquiterpene components, such as E- β -caryophyllene, E- β -farnesene, α -humulene, β -bisabolene and caryophyllene oxide. While, hydrosol extract was rich to methyl eugenol component. The results showed that essential oil and hydrosol extract pre-

sented a promising antifungal activity against *A. alternata*, *B. cinerea* and *P. expansum*. The results also demonstrated that both extracts of *M. vulgare* demonstrated a good effect against *P. expansum*, responsible for the decay of apple fruits and to improve its quality during postharvest. These activities can be related to the presence of sesquiterpenes and phenolic components for oil and hydrosol extract, respectively. Further research is needed to identify the activities of its sesquiterpene and monoterpene components. In addition, the large-scale investigations are required to evaluate its cost and efficacy in the food system in order to develop new formulations for use as fungicides.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals/humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the director of COSNA laboratory, Pr ARRAR Zoheir for his help in performing the GC and GC-MS analyses.

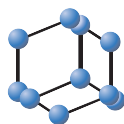
REFERENCES

- Spotts, R.A.; Cervantes, L.A. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis.*, **1986**, *70*, 106-108. [http://dx.doi.org/10.1094/PD-70-106]
- Attrassi, K.; Selmaoui, K.; Ouazzani, T.A.; Badoc, A.; Douira, A. Biologie et physiologie des principaux agents fongiques de la pourriture des pommes en conservation et lutte chimique par l'azoxystrobine. *Bull. Soc. Pharm. Bord.*, **2005**, *144*, 47-62.
- Amiri, A.; Dugas, R.; Pichot, A.L.; Bompeix, G. *In vitro* and *in vivo* [corrected] activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, **2008**, *126*(1-2), 13-19. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.022] [PMID: 18554737]
- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi, 4thEd. *The American Phytopathological Society*, **2006**.
- Bauer, K.; Garbe, D.; Ssurburg, H. Common Fragrance and Flavor Materials. *VCH Publishers.*, (2nd ed.), **1991**.
- Belhattach, R.; Larous, L.; Figueiredo, A.C.; Santos, P.A.G.; Costa, M.M.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, *18*, 369-373. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699116]
- Bouayad Alam, S.; Gaouar Benyelles, N.; Dib, M.A.; Djabou, N.; Tabti, L.; Paolini, J.; Muselli, A.; Costa, J. Antifungal activity of essential oils of three aromatic plants from western Algeria against five fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Appl. Bot. Food Qual.*, **2014**, *87*, 56-61.
- Bougatsos, C.; Ngassapa, O.; Runyoro, D.K.B.; Chinou, I.B. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.*, **2004**, *59*(5-6), 368-372. [http://dx.doi.org/10.1515/znc-2004-5-614] [PMID: 18998403]
- Chavan, M.J.; Wakte, P.S.; Shinde, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, **2010**, *17*(2), 149-151. [http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016] [PMID: 19576741]
- Cheng, S.S.; Wu, C.L.; Chang, H.T.; Kao, Y.T.; Chang, S.T. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. *J. Chem. Ecol.*, **2004**, *30*(10), 1957-1967. [http://dx.doi.org/10.1023/B:JOEC.0000045588.67710.74] [PMID: 15609830]
- Croteau, R.; Ketchum, R.E.; Long, R.M.; Kaspera, R.; Wildung, M.R. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochem. Rev.*, **2006**, *5*(1), 75-97. [http://dx.doi.org/10.1007/s11101-005-3748-2] [PMID: 20622989]
- Dikbas, N.; Kotan, R.; Dadasoglu, F.; Sahin, F. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *Int. J. Food Microbiol.*, **2008**, *124*(2), 179-182. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.034] [PMID: 18455819]
- Mari, M.; Neri, F.; Bertolini, P. Novel approach to prevent and control postharvest diseases of fruits. *Stewart Postharvest Rev.*, **2007**, *3*, 1-7. [http://dx.doi.org/10.2212/spr.2007.6.4]
- Kumar, A.; Shukla, R.; Singh, P.; Prasad, C.S.; Dubey, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post-harvest fungal infestation of food commodities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol. J.*, **2008**, *4*, 575-580. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2007.12.005]
- Gatto, M.A.; Ippolito, A.; Linsalata, V.; Cascarano, N.A.; Nigro, F.; Va-nadia, S.; Di Venere, D. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, **2011**, *61*, 72-82. [http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.02.005]
- Amiri, A.; Dugas, R.; Pichot, A.L.; Bompeix, G. *In vitro* and *in vivo* [corrected] activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, **2008**, *126*(1-2), 13-19. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.022] [PMID: 18554737]
- Neri, F.; Mari, M.; Brigati, S. Control of *Penicillium expansum* by volatile compounds. *Plant Pathol.*, **2006**, *55*, 100-105. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01312.x]
- Znini, M.; Cristofari, G.; Majidi, L.; Mazouz, H.; Tomi, P.; Paolini, J.; Costa, J. Antifungal activity of essential oil from *Asteriscus graveolens* against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, *6*(11), 1763-1768. [http://dx.doi.org/10.1177/1934578X1100601147] [PMID: 2224306]
- Lodhi, S.; Vadnere, G.P.; Kant, V.K.; Usman, S.R. *Marrubium vulgare* L.: A review on phytochemical and pharmacological aspects. *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, **2017**, *6*(4), 429-452. [http://dx.doi.org/10.5455/jice.20170713060840]
- Meyre-Silva, C.; Cechinel-Filho, V. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus *marrubium*. *Curr. Pharm. Des.*, **2010**, *16*(31), 3503-3518. [http://dx.doi.org/10.2174/138161210793563392] [PMID: 20942795]
- Morteza-Semnani, K.; Saedi, M.; Babanezhad, E. The Essential Oil Composition of *Marrubium vulgare* L. from Iran. *J. Essent. Oil Res.*, **2008**, *20*, 488-490. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2008.9700065]

- [22] Khanavi, M.; Ghasemian, L.; Hosseiny Motlagh, E. Hadjia khoondi, A.; Shafiee, A. Chemical composition of the essential oils of *Marrubium parviflorum* Fisch. & C.A. Mey and *Marrubium vulgare* L. from Iran. *Flavour Fragrance J.*, **2005**, *20*, 324-326. [http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1425]
- [23] Asadipour, A.; Mehrabani, M.; Nazeri, V.; Tabarraii, M. Composition of the essential oil of *Marrubium vulgare* L. *Ulm-i-Daroei*, **2005**, *2*, 77-82.
- [24] Nagy, M.; Svajdlenka, E. Comparison of Essential Oils from *Marrubium vulgare* L. and *M. peregrinum* L. *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, *10*, 585-587. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1998.9700978]
- [25] Belhattach, R.; Larous, L.; Figueiredo, A.C.; Santos, P.A.G.; Costa, M.M.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, *18*, 369-373. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699116]
- [26] Santos, C.; Costa, M.M.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, *18*, 369-373. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699116]
- [27] Hamdaoui, B.; Aidi Wannes, W.; Marrakchi, M.; Ben Brahim, N.; Marzouk, B. Essential Oil Composition of Two Tunisian Horehound Species: *Marrubium vulgare* L. and *Marrubium aschersonii* Magnus. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, **2013**, *16*, 608-612. [http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2013.854492]
- [28] Jennings, W.; Shibamoto, T. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography. *Academic Press.*, **1980**, http://webbook.nist.gov/chemistry2008.
- [29] Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C. Introduction to Food and Airborne Fungi *Centraal bureau voor Schimmel cultures.*, (7th ed.), **2004**.
- [30] De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gené, J.; Figueras, M.J. Atlas of Clinical Fungi CD-ROM. *Ed. CBS.*, (3rd ed.), **2009**.
- [31] Belabbes, R.; Dib, M.E.A.; Djabou, N.; Ilias, F.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem. Biodivers.*, **2017**, *14*(5)e1600482 [http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600482] [PMID: 28109063]
- [32] Tian, J.; Ban, X.; Zeng, H.; He, J.; Huang, B.; Wang, Y. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int. J. Food Microbiol.*, **2011**, *145*(2-3), 464-470. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.023] [PMID: 21320730]
- [33] Singh, P.; Srivastava, B.; Kumar, A.; Kumar, R.; Dubey, N.K.; Gupta, R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *J. Sci. Food Agric.*, **2008**, *88*, 2421-2425. [http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3342]
- [34] Tabet Zatla, A.; Dib, M.E.A.; Djabou, N.; Ilias, F.; Costa, J.; Muselli, A. Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. *J. Essent. Oil Res.*, **2017**, *29*, 391-399. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2017.1322008]
- [35] De Lucca, A.J.; Pauli, A.; Schilcher, H.; Sien, T.; Bhatnagar, D.; Walsh, T.J. Fungicidal and Bactericidal Properties of Bisabolol and Dragosantol. *J. Essent. Oil Res.*, **2011**, *23*, 47-54. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2011.9700457]
- [36] Weel, K.G.C.; Venskutonis, P.R.; Pukalskas, A.; Gruzdiene, D.; Linssen, J.P.H. Antioxidant Activity of Horehound (*Marrubium vulgare* L.) Grown in Lithuania. *Fett/Lipid.*, **101**, 395-400. **1999**.
- [37] Saleh, M.M.; Glombitza, K.W. Volatile Oil of *Marrubium vulgare* and its Anti-schistosomal Activity. *Planta Med.*, **1989**, *55*, 105-108. [http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-961873]
- [38] Kadri, A.; Zarai, Z.; Bekir, A.; Gharsallah, N.; Damak, M.; Gdoura, R. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *Afr. J. Biotechnol.*, **2011**, *10*, 3908-3914.
- [39] Santos, C.; Costa, M.M.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, *18*, 369-373. [http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699116]
- [40] Abadi, A.; Abdellatif, F. The antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of *Marrubium vulgare* growing wild in Eastern Algeria. *International Letters of Chemistry. Physics and Astronomy*, **2013**, *10*, 159-166.
- [41] Bauer, K.; Garbe, D.; Surburg, H. Common Fragrance and Flavor Materials. *VCH Publishers.*, (2nd ed.), **1991**.
- [42] Sköld, M.; Karlberg, A.T.; Matura, M.; Börje, A. The fragrance chemical β -caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem. Toxicol.*, **2006**, *44*(4), 538-545. [http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2005.08.028] [PMID: 16226832]
- [43] Cheng, S.S.; Wu, C.L.; Chang, H.T.; Kao, Y.T.; Chang, S.T. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. *J. Chem. Ecol.*, **2004**, *30*(10), 1957-1967. [http://dx.doi.org/10.1023/B:JOEC.0000045588.67710.74] [PMID: 15609830]
- [44] Goren, A.C.; Piozzi, F.; Akcicek, E.; Kılıç, T.; Çarkç, I.S.; Mozioglu, E.; Setzer, W.N. Essential oil composition of twenty-two *Stachysspecies* (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem. Lett.*, **2011**, *4*, 448-453. [http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.013]
- [45] Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Di Cesare Mannelli, L.; Mazzanti, G.; Bartolini, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Pharmacology*, **2001**, *56*(5-7), 387-389. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01092-8] [PMID: 11482764]
- [46] Kubo, I.; Chaudhuri, S.K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Saito, T.; Ishikawa, H.; Haraguchi, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med.*, **1996**, *62*(5), 427-430. [http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957932] [PMID: 8923808]
- [47] da Silva, S.L.; Figueiredo, P.M.S.; Yano, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, *576*(1-3), 180-188. [http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.065] [PMID: 17716654]
- [48] Di Sotto, A.; Mazzanti, G.; Carbone, F.; Hrelia, P.; Maffei, F. Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.*, **2010**, *699*(1-2), 23-28. [http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.04.008] [PMID: 20398787]
- [49] Tung, Y.T.; Chua, M.T.; Wang, S.Y.; Chang, S.T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Biore-source Technol.*, **2008**, *99*(9), 3908-3913. [http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.050] [PMID: 17826984]
- [50] Dahham, S.S.; Tabana, Y.M.; Iqbal, M.A.; Ahamed, M.B.; Ezzat, M.O.; Majid, A.S.; Majid, A.M. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, **2015**, *20*(7), 11808-11829. [http://dx.doi.org/10.3390/molecules200711808] [PMID: 26132906]
- [51] Wu, C.L.; Chien, S.C.; Wang, S.Y.; Kuo, Y.H.; Chang, S.T. Structure-activity relationships of cadinane-type sesquiterpene derivatives against wood-decay fungi. *Holzforchung*, **2005**, *59*, 620-627. [http://dx.doi.org/10.1515/HF.2005.100]
- [52] Ali, A.; Tabanca, N.; Demirci, B.; Blythe, E.K.; Ali, Z.; Baser, K.H.; Khan, I.A.; Khan, I.A. Chemical composition and biological activity of four *salvia* essential oils and individual compounds against two species of mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, *63*(2), 447-456. [http://dx.doi.org/10.1021/jf504976f] [PMID: 25531412]
- [53] Bougatsos, C.; Ngassapa, O.; Runyoro, D.K.B.; Chinou, I.B. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.*, **2004**, *59*(5-6), 368-372. [http://dx.doi.org/10.1515/znc-2004-5-614] [PMID: 18998403]
- [54] Kamatou, G.P.P.; Viljoen, A.M. A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -Bisabolol and α -Bisabolol-Rich Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2010**, *87*, 1-7. [http://dx.doi.org/10.1007/s11746-009-1483-3]

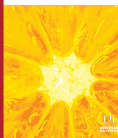
- [56] Houicher, A.; Hechachna, H.; Özogul, F. *In Vitro* Determination of the Antifungal Activity of *Artemisia campestris* Essential Oil from Algeria. *Int. J. Food Prop.*, **2016**, *19*, 1749-1756. [http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2015.1107734]
- [57] Fontenelle, R.O.S.; Morais, S.M.; Brito, E.H.S.; Kerntopf, M.R.; Brillhante, R.S.N.; Cordeiro, R.A.; Tomé, A.R.; Queiroz, M.G.R.; Nascimento, N.R.F.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2007**, *59*(5), 934-940. [http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm066] [PMID: 17376793]
- [58] Botelho, M.A.; Nogueira, N.A.P.; Bastos, G.M.; Fonseca, S.G.C.; Lemos, T.L.G.; Matos, F.J.A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V.S.; Brito, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2007**, *40*(3), 349-356. [http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2007000300010] [PMID: 17334532]
- [59] Fontenelle, R.O.S.; Morais, S.M.; Brito, E.H.S.; Brillhante, R.S.N.; Cordeiro, R.A.; Nascimento, N.R.F.; Kerntopf, M.R.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *J. Appl. Microbiol.*, **2008**, *104*(5), 1383-1390. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03707.x] [PMID: 18298533]
- [60] Yang, D.; Michel, L.; Chaumont, J.P.; Millet-Clerc, J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia*, **1999**, *148*(2), 79-82. [http://dx.doi.org/10.1023/A:1007178924408] [PMID: 11189747]
- [61] D'Auria, F.D.; Tecca, M.; Strippoli, V.; Salvatore, G.; Battinelli, L.; Mazzanti, G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. *Med. Mycol.*, **2005**, *43*(5), 391-396. [http://dx.doi.org/10.1080/13693780400004810] [PMID: 16178366]

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Echinops spinosus* and *Carlina vulgaris* Rich in Polyacetylene Compounds

Current Nutrition & Food Science



Rania Belabbes¹, Imane R. Mami², Mohammed E.A. Dib^{1,*}, KENZA Mejdoub³, Boufeldja Tabti¹, Jean Costa⁴ and Alain Muselli⁴

¹Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie;

²Laboratory of Organic Chemistry, Natural Substances and Analyses (COSNA), University of Tlemcen, Algeria;

³Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie;

⁴Laboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134 SPE, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corté, France

Abstract: Background: The essential oils of aromatic plants are increasingly used as new bio-control alternative agents against microbial strains and insect pests of fruits and vegetables, because of their specificity of biodegradable nature.

Objectives: This work, treats for the first time the chemical composition, antioxidant, antifungal and insecticidal activities of the essential oils obtained from *Echinops spinosus* and *Carlina vulgaris* from Algeria.

Methods: The chemical compositions of oils were investigated using GC-FID and GC/MS. Antioxidant activity was assessed using three methods (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) and β -carotene assay). Fumigation toxicity of *E. spinosus* and *C. vulgaris* essential oils was tested against *Bactrocera oleae* pests of olives.

Results: Eighteen and thirteen components representing 95.4 and 97.9% were identified in root essential oils from *Echinops spinosus* and *Carlina vulgaris*, respectively. Polyacetylenes were the majority compounds of essential oils. 5-(But-1-yn-3-enyl)-2,2'-bithiophene and α -terthienyle were highly dominants in the *E. spinosus* essential oil from the roots (54.4 and 26.3%, respectively). Roots of *C. vulgaris* produce an essential oil dominated by carlina oxide (33.7%) and 13-methoxy carlina oxide (11.5%). Comparison of the antioxidant activity of *E. spinosus* essential oil showed more important antioxidant effect than *C. vulgaris* essential oil and the synthetic antioxidant (BHT). Evaluation of the antifungal activity showed an interesting efficiency of both essential oils against *P. expansum* and *A. niger* with EC₅₀s varied from 5 to 14.5 mg/L. *C. arvensis* essential oil exhibited good larvicidal properties. At the concentration of 325 μ L/L air, the oil caused mortality of 100% for *Bactrocera Oleae* adults after 24 h of exposure.

Conclusion: Both essential oils rich to polyacetylenes and polythiophenes components have shown interesting biological activities, which suggests that plants have the potential to be used as bio-pesticides and provide an alternative to chemical pesticides.

Keywords: Biological activities, *C. vulgaris*, chemical pesticides, *E. spinosus*, essential oils, insecticidal effect.

1. INTRODUCTION

Plant extracts are increasingly sought after their antioxidant properties and to fight against microbial strains and harmful insects of fruits and vegetables, because of their specificity of biodegradable nature. It has been proved that caffeoylquinic acid and flavonoids present in the *Cynara*

cardunculus extracts contain antioxidant activity, against free radicals and are effective in the prevention of severe coronary artery diseases, atherosclerosis, exerting also anti-cancer activity [1]. The 3,4-DHPEA-EDA isolated from olives was shown to have anti-inflammatory pharmacological effects. Functional data have shown that 3,4-DHPEA-EDA diminished monocyte adhesion to HUVECs [2], while, the biomimetic synthesis of 3,4-DHPEA-EDA [2-(3,4-hydroxyphenyl) ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl) hex-4-enoate], starting from natural demethyloleuropein present in olive tissues has a greater scavenging capacity against peroxy

*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; Tel: 00213554378192; E-mail: a_dibdz@yahoo.fr

radicals than have oleuropein [3]. The beneficial pharmacological effects of oleuropein, the major bioactive compounds in *Olea europaea* were antioxidant, cardio protective, anticancer, antimicrobial and neuroprotective [4]. On the other hand, *Ballota nigra* essential oil and hydrosol extract significantly reduce decay in artificially inoculated tomato by *Alternaria alternata* [5]. Asteraceae family is the largest of the plant kingdom. It includes many species used in ethnomedicine that are found in arid and semi-arid regions of subtropical and low-temperate latitudes [6]. The Algerian soil has about 109 genus and more than 408 species [7]. *E. spinosus* genus belongs to the family of Asteraceae, it is a taxonomically complex group, it comprises about 100 species distributed around the world [8]. In Algeria, this genus is represented by two species: *E. strigosus* L. and *E. spinosus* [7]. The roots of several *Echinops* species have been widely used in folk medicine for the treatment of many diseases like migraine, diarrhea, heart pain, infections, intestinal worm infestation, hemorrhoids and reduce asthma attack [9, 10]. Previous phytochemical studies on the root of *Echinops* species have shown the presence of thiophenes and sesquiterpenoids such as echinopines A and B [11]. The genus *Carlina* L. (Asteraceae) consists of about twenty species that are distributed throughout Europe and Asia. Species of the genus *Carlina* L. are commonly used for medicinal and nutritional purposes [12]. The roots of *Carlina radix* and *Carlina acaulis* L. have been used as a diuretic, diaphoretic and stomachic, and also against catarrh [13]. Although these species are commonly used in traditional medicine, to our knowledge, there are no studies on the chemical composition and biological activities of *E. spinosus* and *C. vulgaris* essential oils. Reports on the phytochemistry of *Carlina* genus are rare and they mainly describe the identification of pentacyclic triterpenes [14]. In order to identify possible natural sources from both of these plants and as part to our program to search for bioactive constituents from plants, this study was focused on the determination of the chemical composition of the essential oil of *E. spinosus* and *C. vulgaris* harvested in the northwest of Algeria using GC-FID and GC/MS analyses. Moreover, the antioxidant, antifungal and larvicidal activities of essential oils were investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

The roots of *C. vulgaris* and *E. spinosus* were harvested from Sidi Djilali and Amieur regions of Tlemcen (Algeria), in May 2017, respectively. The plants collected were identified by the Laboratory of Ecology and Ecosystem Management of the University of Tlemcen (Algeria). Voucher specimens were deposited with the Herbarium of the University of Tlemcen. A portion of each organ was stored at 4°C for eventual further studies. The essential oils were obtained by steam distillation for 5 h using Clevenger-type apparatus. The yields of the oils were, respectively, 0.8% and 0.11%.

2.2. Gas Chromatography

Analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and 2 fused-silica capillary columns (60 m

x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Essential oils were injected in the split mode (1/50), using hydrogen as the carrier gas (0.7 mL min⁻¹); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software.

2.3. Gas Chromatography-mass Spectrometry

The oils and the fractions obtained by CC were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole analyzer, directly coupled with a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Other GC conditions were the same as described above. The ion source temperature was 150°C and energy ionization 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35-350 Da and scan mass of 1 s. Oil injected volume was 0.1 µL and fraction injected volume of 0.2 µL.

2.4. Component Identification and Quantification

Identification of the components was made (i) through the comparison of their GC retention indices (RI) on nonpolar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with those of authentic compounds or literature data [15-18] and (ii) also through computer matching with commercial mass spectral libraries [15-20] and comparison of spectra with those of in-house laboratory library. Component quantification was carried out using peak normalization % abundances calculated by integrating FID response factors relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard [21].

2.5. Pathogenic Fungal Strains

Penicillium expansum, *Aspergillus niger* and *Fusarium solani* were obtained from olives by harvesting from diseased fruits and maintained in potato dextrose agar (PDA, Sigma-Aldrich, USA) in a growth chamber at 23°C for 14 days in the dark. Each isolate was purified by a single spore isolation technique and identified based on cultural and morphological characteristics.

2.6. In Vitro Antifungal Assay

Antifungal activity of the essential oils was tested against the aforementioned strains. The method used was based on a method published by Belabbes *et al.* [22]. Aliquots of extracts dissolved separately in 0.5 ml of 10% (v/v) DMSO were pipetted aseptically to 9 cm glass Petri dishes containing 9.5 ml of molten PDA to procure the requisite concentrations of essential oils (5, 10 and 20 mL/L). Control plates (without essential oils) were inoculated following the same procedure. A 9 mm fungal disc of mycelial material, cut from the periphery of a 5-dayold culture with a sterile cork-borer, was inoculated aseptically to the center of the pre-

pared treatment and control Petri dishes. The plates were sealed with polyethylene film and incubated at a temperature of 27°C. The efficacy of the treatment was evaluated each day for 7 days by measuring the average of 2 perpendicular diameters of the colony. All tests were performed in triplicate. Percentage inhibition of the radial growth of the tested fungi by the oils compared with the control was calculated at day 7, using the following formula [23, 24]:

$$(I\%) = [DC-DT/DC] \times 100$$

where DC and DT are average diameters of the fungal colony of control and treatment, respectively.

2.7. Fumigation Toxicity of Essential Oils Against *Bac-trocera oleae*

To determine the fumigant toxicity of essential oils, appropriate concentrations, were applied separately on the filter papers (Whatman No. 1, 2 cm diameter) to achieve the concentrations ranged from 100 to 325 $\mu\text{L/L}$ air without using any solvent, and the filter papers were attached to the under-surface of lids of plastic jars with 50-ml volumes. The control sets received no oil. The lids were screwed tightly on the jars containing 15 insects each, all of the same age. These were kept at a temperature of 25-26°C and 80-85% relative humidity [25]. Mortality was checked after 24 h from the commencement of exposure. The mortality of insect was expressed in % and calculated by using the Abbott correction formula [26]:

$$\text{Corrected mortality} = (\text{Observed mortality in treatment} - \text{Observed mortality in control}/100 - \text{Control mortality}) \times 100$$

$$\text{Percentage mortality} = (\text{Number of dead larvae}/ \text{Number of larvae introduced}) \times 100$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Composition of the Essential Oils

The roots of *E. spinosus* and *C. vulgaris* were abstracted by hydrodistillation and the essential oils were obtained in the yields of 0.11 and 0.8% (w/w), respectively. The total number of chemical components identified in *E. spinosus* essential oil was eighteen, accounting for 95.4% of the total oil composition (Table 1). Analysis of *E. spinosus* essential oil identified 18 compounds representing 95.4% of the chemical composition of the mixture. Among them, eleven sesquiterpenes (13.4%), four monoterpenes (1.3%), two polythiophenes and one non-terpenic compound were identified. The essential oil was dominated principally by polythiophene compounds (80.7%) in which 5-(But-1-yn-3-enyl)-2,2'-bithiophene (54.4%) and α -terthienyl (26.3%) were the main components. Sesquiterpenes were represented by (E)- β -caryophyllene (6.2%), caryophyllene oxide (4.9%) and (Z, Z)-farnesol (1.1%) (Table 1). Many investigations deal with the chemical composition of essential oils of the *Echinops* species. *E. bannaticus* and *E. sphaerocephalus* were dominated principally by polythiophene compounds such 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithienyl (47.3% and 48.9%, respectively) and α -terthienyl (15.5% and 13.7%, respectively) [27]. The essential oil of *E. giganteus* var. was dominated

by silphiperfol-6-ene (26.9%), presilphiperfol-7(8)-ene (9.4%) and presilphiperfolan-8-ol (6.7%) [20], while the major constituents found in essential oil of *E. kebericho* were eudesm-7(11)-en-4-ol (14.3%), caryophyllene oxide (9.7%), τ -cadinol (8.3%), and (E)-nerolidol (7.2%) [28].

The acetylenic fraction (45.2%) constituted the majority of the composition of *C. vulgaris* essential oil followed by hydrocarbon diterpenes (16.5%) and hydrocarbon monoterpenes (13.9%). The essential oil of *C. vulgaris* was dominated mainly by carlina oxide (23.7%), hexadecanoic acid (15.0%), neophytadiene (13.4%) and 13-methoxy carlina oxide (11.5%). Other less important compounds were limonene (9.5%), myrcene (3.9%), viridiflorol (3.6%), phytone (3.1%) and (E)- β -caryophyllene (2.1%) (Table 1). Two previous studies on the chemical composition of the essential oil of the species *C. acanthifolia* and *C. acaulis* confirm the predominance of carlina oxide (91.5 and 97.2%, respectively) [13, 29].

3.2. Evaluation of the Antioxidant Activities of Essential Oils

The antioxidant properties were evaluated using three different methods i) Radical scavenging activity, ii) the Reducing power, and iii) the β -carotene bleaching method, using BHT as a positive control. Free radical scavenging capacity of the essential oils, measured by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay is shown in Table 2. We noticed that *E. spinosus* and *C. vulgaris* essential oils have a very strong antioxidant power. Indeed, the values of their IC_{50} (14.6 and 15 mg / L, respectively) were lower than that of synthetic BHT (IC_{50} = 17.3 mg/L). The antioxidant activity of the essential oils evaluated using the FRAP method showed that the reducing power of essential oils was found to be proportional to the concentration at which each essential oil was tested. Fig. (1) showed that the highest activity was exhibited by *E. spinosus* essential oil with absorbances comparable to that of the synthetic antioxidant (BHT), while the lowest activity was measured from *C. vulgaris* oil.

The β -carotene/linoleic acid decolorization technique makes it possible to evaluate the antioxidant activity of essential oils by inhibiting the lipid peroxidation by following the absorbance over time. Table 2 shows the percentage inhibition of both essential oils as a function of the concentrations tested. The absorbances of the reaction media in the absence of the extracts diminish rapidly over time, while the addition of essential oils or BHT slows down this decline [30]. It appears that *E. spinosus* essential oil has the highest activity with an IC_{50} value of 0.3 mg/L, about 15 times more active than the synthetic antioxidant (IC_{50} = 4.6 mg/L). In contrast, *C. vulgaris* essential oil was the least effective, with an IC_{50} of 10.6 mg/L (Table 2). *E. spinosus* essential oil showed strong antioxidant activity with an IC_{50} that was significantly lower than that of the BHT control, while, *C. vulgaris* had moderate antioxidant activity. These antioxidant properties are probably related to their chemical profile, in particular to the relatively high percentage of acetylenic compounds and oxygenated sesquiterpenes. The antioxidant activity of *E. spinosus* essential oil is likely related to the

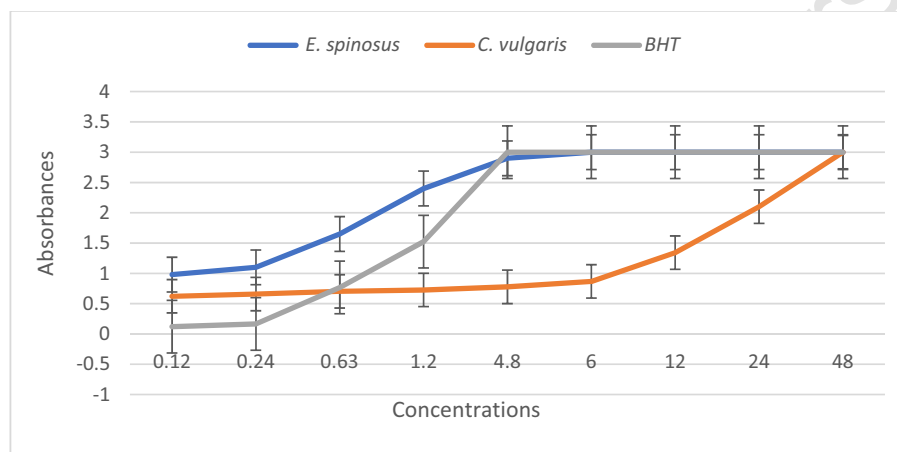
Table 1. Chemical composition of essential oils.

No. ^a	Compounds	Lit/RI ^b	RI ^a ^c	RI _p ^d	<i>E. Spinosus</i>	<i>C. vulgaris</i>	Identification ^e
1	α -Thujene	932	925	1014	0.1	-	RI, MS
2	Myrcene	980	979	1159	0.5	3.9	RI, MS
3	Decane	1000	1000	1000	-	0.7	RI, MS
5	p-Cymene	1011	1013	1270	-	0.5	RI, MS
6	Limonene	1020	1023	1196	-	9.5	RI, MS
7	γ -Terpinene	1047	1049	1248	0.6	-	RI, MS
8	Terpinolene	1082	1079	1274	0.1	-	RI, MS
9	(E)-2-Nonen-1-ol	1153	1161	1672	tr	-	RI, MS
10	Carvone	1222	1218	1738	-	0.6	RI, MS
11	Thymol	1266	1278	2189	-	0.3	RI, MS
12	(E)- β -Caryophyllene	1424	1417	1593	6.2	2.1	RI, MS
13	(E)- β -Farnesene	1448	1450	1660	0.6	-	RI, MS
14	α -Humulene	1456	1450	1666	0.3	-	RI, MS
15	(E)-Nérolidol	1544	1548	2032	0.1	-	RI, MS
16	Epiglobulol	1558	1556	2016	tr	-	RI, MS
17	Caryophyllene oxide	1572	1570	1982	4.9	-	RI, MS
18	Carlina oxide	-	1580	2380	-	33.7	RI, MS, NMR
19	cis-Hydrate sesquisabinene	1586	1566	2099	0.1	-	RI, MS
20	Viridiflorol	1592	1594	2083	tr	3.6	RI, MS
21	τ -Muurolol	1633	1626	2138	tr	-	RI, MS
22	α -Cadinol	1643	1641	2223	0.1	-	RI, MS
23	(Z,Z)-Farnesol	1653	1657	2267	1.1	-	RI, MS
24	13-Methoxy carlina oxide	1798	1800	2105	-	11.5	RI, MS
25	5-(But-1-yn-3-enyl)-2,2'-bithiophene	-	1881	2367	54.4	-	RI, MS, NMR
26	α -Terthienyle	-	2170	2904	26.3	-	RI, MS, NMR
27	Phytone	1844	1846	2131	-	3.1	IR, SM
28	Neophytadiene	1840	1851	1922	-	13.4	IR, SM
29	Hexadecanoic acid	1942	2005	1944	-	15.0	IR, SM
% of identification		-	-	-	95.4	97.9	-
% Oxygenated monoterpenes		-	-	-	-	0.9	-
% Oxygenated sesquiterpenes		-	-	-	6.3	3.6	-
% Sesquiterpene hydrocarbons		-	-	-	7.1	2.1	-
% Monoterpene hydrocarbons		-	-	-	1.3	13.9	-
% Diterpenes hydrocarbons		-	-	-	-	16.5	-
% Sulfur polyacetylene		-	-	-	80.7	-	-
% Oxygenated polyacetylene		-	-	-	-	45.2	-
% Others		-	-	-	-	15.7	-

^a: Order of elution is given on apolar column (Rtx-1); ^b: Retention indices of literature on the apolar column (RI Lit) reported from König *et al.*, 2001; ^c: Retention indices on the apolar Rtx-1 column; ^d: Retention indices on the polar Rtx-wax column; ^e: RI: Retention Indices; MS: Mass Spectra in electronic impact mode.

Table 2. IC₅₀ of essential oils measured by DPPH and β-carotene/linoleic acid inhibition methods.

Samples	IC ₅₀ (μg/mL)	
	DPPH	β-carotene/Linoleic Acid Inhibition
<i>E. spinosus</i>	15.0	0.3
<i>C. vulgaris</i>	14.6	10.6
BHT	17.3	4.6

**Fig. (1).** Reducing power of *E. spinosus* and *C. vulgaris* essential oils.

presence of the two major compounds sulfur 5-(but-1-yn-3-enyl)-2,2'-bithiophene and α-terthienyl. It has been shown that the antioxidant properties of sulfur compounds are commonly compared to the antioxidant properties of selenium. However, the antioxidant activities associated with sulfur and selenium can be very distinct, each using different antioxidant mechanisms to prevent oxidative cell damage [31, 32]. However, the antioxidant potential of *C. vulgaris* essential oil can be related to the presence of carline oxide, since this compound seems to be responsible for the antioxidant power of *C. acanthifolia* essential oil [30].

3.3. In Vitro Antifungal Activity of Essential Oils Against Plant Fungi

The inhibitory effect of *E. spinosus* and *C. vulgaris* essential oils was evaluated against three fungal phytopathogens: *F. solani*, *P. expansum* and *A. niger* (Table 3). The tests showed the variability of inhibition according to the pathogenic fungi tested. The strains *P. expansum* and *A. niger* were more sensitive to *C. vulgaris* and *E. spinosus* essential oils than that of *F. solani*. *C. vulgaris* essential oil showed inhibitory activity against 2 of the 3 fungi tested with inhibition percentages of 100% for *P. expansum* and *A. niger* at the concentration of 20 mL/L, respectively. It should be noted that no inhibition was observed for *F. solani*. The percentage inhibitions of *E. spinosus* essential oil were 79, 69 and 67%, for *P. expansum*, *A. niger* and *F. solani*, respectively. The approach of minimal concentrations causing 50% inhibition of mycelial growth (EC₅₀) showed that *C. vulgaris* essential oil has the strongest activity against *P. expansum* and *A. niger*, with values EC₅₀ less than 5 mg/L,

whereas, *F. solani* (> 20 mg/L) appeared to be the less sensitive strain (Fig. 2). In contrast, with EC₅₀s of 9.9, 14.5 and 18.5 mg/L, *P. expansum*, *A. niger* and *F. solani* appeared to be the less sensitive strains to the essential oil of *E. spinosus* (Fig. 2). In recent decades, essential oils have attracted increased interest and, as a result, have been the subject of extensive research, primarily in *in vitro* systems. *F. solani*, *P. expansum* and *A. niger* are responsible for a wide range of plant diseases such as wilt and canker, root, stem and fruit rot [33]. The evaluation of the antifungal properties of the essential oils of both plants subjected to the present study showed very good antifungal activities. This protective effect of *C. vulgaris* is probably due to the major component of the essential oil, carlina oxide. However, no information on the fungicidal properties of this molecule is available in the literature. For *E. spinosus* essential oil, it seems that its activity is related to sulfur compounds such as 5-(but-1-yn-3-enyl)-2,2'-bithiophene and α-terthienyl. Thiophenes as natural products possess various biological activities: antitumoral, phototoxic, antifungal and antiviral [34, 35]. Indeed, it has been shown to possess potent cytotoxic activity against several organisms, including bacteria, fungi and nematodes [36]. Moreover, the extent of the antifungal activity can be related to the effect produced by the interaction of all the constituents of the essential oil, both those present in high proportion and the minority ones.

3.4. Fumigation Toxicity of Essential Oils

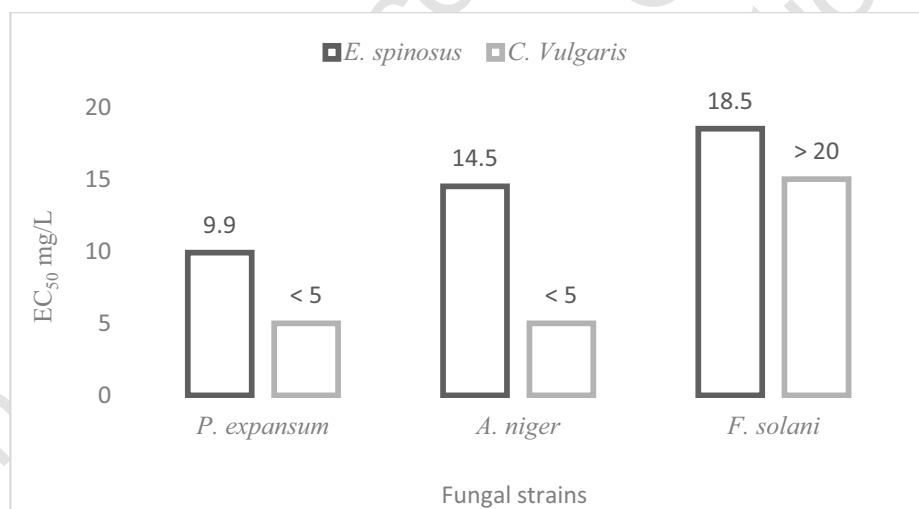
The results of fumigation toxicity of *E. spinosus* and *C. vulgaris* essential oils against *B. oleae* fly are summarized in Table 4. *C. vulgaris* essential oil proved to be very biocidal

Table 3. *In vitro* antifungal activities of essential oils against phytopathogenic fungi.

Microorganisms	Essential Oil of <i>E. spinosus</i> (mg/L)			Essential Oil of <i>C. vulgaris</i> (mg/L)		
	5	10	20	5	10	20
<i>P. expansum</i>	33 ± 3.2	53 ± 2.4	79 ± 4.3	56.6 ± 3.4	58.9 ± 3.4	100 ± 00
<i>A. niger</i>	23 ± 4.4	47 ± 2.3	69 ± 3.5	51.1 ± 1.1	55.5 ± 1.1	100 ± 00
<i>F. solani</i>	11 ± 1.3	33 ± 3.5	67 ± 2.3	00 ± 00	00 ± 00	11.1 ± 3.2

Table 4. Insecticidal activity of essential oils on *B. oleae* adults after 24 h of exposure.

Concentrations (µL/L Air)	% Mortality	
	<i>E. spinosus</i>	<i>C. vulgaris</i>
125	00 ± 00 ^a	40,0 ± 2,4 ^a
275	10,3 ± 0.1 ^a	80,0 ± 1.1 ^b
325	16,0 ± 0.1 ^a	100 ± 00 ^c
DL ₅₀	/	161.8
DL ₉₀	/	298.7

**Fig. (2).** Inhibitory concentration values of 50% of mycelial growth (EC₅₀ in mg/L) of essential oils.

with respect to adults of *B. oleae*: a mortality of 100% of the population is noted with a dose of 325 µL/L air after 24 hours of exposure. The lethal doses that cause the mortality of 50% and 90% of adult *B. oleae* were 161.8 and 298.7 µL/L air, respectively. Regarding *E. spinosus* essential oil, a low biocidal effect was observed (Table 4). The objective of this study was, to examine the possibility of valorization of both plants to search for natural active and biodegradable products that can be used against the insect pests of the olives, *B. oleae*. The evaluation of the insecticidal properties of *C. vulgaris* essential oil carried out in the present study showed very interesting activities. Carlina oxide has been shown to have high activity and selectivity against Trypanosomabrucei, a parasite responsible for sleeping sickness known as African trypanosomiasis [37].

CONCLUSION

This is the first report on the chemical composition and biological activities of *E. spinosus* and *C. vulgaris* essential oils. The chemical composition of *E. spinosus* essential oil has been characterized by a significant amount of sulfur compounds, while, *C. vulgaris* essential oil has been characterized by a mixture of acetylenic, diterpenic and monoterpene hydrocarbon compounds. The essential oils had strong antioxidant power, better than synthetic antioxidant BHT. The results of the antifungal activity indicated that the inhibition of mycelial growth was significantly influenced by *C. vulgaris* and *E. spinosus* essential oils. On the other hand, *C. arvensis* essential oil exhibited good larvicidal properties. Both plant species had original chemical compositions and exhibited antioxidant, antifungal and insecticidal activities

that could be used in agriculture as biopesticide against plant diseases.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals/humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The dataset that support the results and findings of this research are available from [MD], upon request.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- Russo A, Perri M, Cione E, Di Gioia ML, Nardi M, Cristina Caroleo M. Biochemical and chemical characterization of *Cynara cardunculus* L. extract and its potential use as co-adjuvant therapy of chronic myeloid leukemia. *J Ethnopharmacol* 2017; 202: 184-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.026> PMID: 28323047
- Sindona G, Caruso A, Cozza A, et al. Anti-inflammatory effect of 3,4-DHPEA-EDA [2-(3,4 -hydroxyphenyl) ethyl (3S, 4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoate] on primary human vascular endothelial cells. *Curr Med Chem* 2012; 19(23): 4006-13. <http://dx.doi.org/10.2174/092986712802002536> PMID: 22680639
- Nardi M, Bonacci S, De Luca G, et al. Biomimetic synthesis and antioxidant evaluation of 3,4-DHPEA-EDA [2-(3,4-hydroxyphenyl) ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoate]. *Food Chem* 2014; 162: 89-93. [2-(3,4 -hydroxyphenyl) ethyl (3S, 4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoate)]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.015> PMID: 24874361
- Nardi M, Bonacci S, Cariati L, et al. Synthesis and antioxidant evaluation of lipophilic oleuropein aglycone derivatives. *Food Funct* 2017; 8(12): 4684-92. <http://dx.doi.org/10.1039/C7FO01105A> PMID: 29160876
- Ain Sebaa N, Tabet Zatl A, Dib MA, Tabti B, Costa J, Alain M. Antifungal activity of essential oil and hydrosol extract of *Ballota nigra* L. and their protective effects against the black rot of tomatoes. *Curr Nutr Food Sci* 2018. [Epub ahead of print].
- Bitsindou M, Lejoly L. Les plantes employées contre les affections hépatiques en médecine traditionnelle africaine. Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la Conférence internationale d'Ethnomédecine. 163-6.
- Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Paris: National Center for Scientific Research 1963.
- Kit T. Seven new species of *Echinops* (Asteraceae). *Ann Bot Fenn* 1995; 32(2): 117-26.
- Ni ZY, Nagashima Y, Zhang ML, et al. 11-Hydroxyisocom-2-en-5-one, a new sesquiterpenoid from *Echinops spinosissimus*. *Chem Nat Compd* 2013; 4(49): 632-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-013-0696-8>
- Bouattour E, Fakhfakh J, Affes M, Chawech R, Damak M, Jarraya R. Chemical constituents of *Echinops spinosus* From Tunisia. *J Nat Comp* 2017; 53(5): 1-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-017-2179-9>
- Dong M, Cong B, Yu SH, et al. *Echinopines* A and B: sesquiterpenoids possessing an unprecedented skeleton from *Echinops spinosus*. *Org Lett* 2008; 10(5): 701-4. <http://dx.doi.org/10.1021/ol702629z> PMID: 18251544
- Strzemeski M, Wójciak-Kosior M, Sowa I, et al. *Carlina* species as a new source of bioactive pentacyclic triterpenes. *Ind Crops Prod* 2016; 94: 498-504. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.025>
- Chalchat J, Djordjevic S, Gorunovic M. Composition of the essential oil from the root of *Carlina acaulis* L. Asteraceae. *J Essent Oil Res* 1996; 8(5): 577-8. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1996.9700696>
- Strzemeski M, Wójciak-Kosior M, Sowa I, et al. *Carlina vulgaris* L. as a source of phytochemicals with antioxidant activity. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 20171891849 <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1891849> PMID: 29181123
- Jennings W, Shibamoto T. Analytical considerations. Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography. 1st ed. New York: Academic Press 1980; pp. 1-27. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384250-3.50004-0>
- König WA, Hochmuth DH, Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils. Library of Mass Finder. Hamburg: Institute of Organic Chemistry 2001.
- National Institute of Standards and Technology. 2008. Available from: www.webbook.nist.gov/chemistry
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data. New-York: Wiley-Interscience 1988.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. Wiley Registry of Mass Spectral Data. In: Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 310d. Palisade: Newfield 1994.
- National Institute of Standards and Technology. PC Version 17 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Norwalk, CT, USA: Perkin-Elmer Corp. 1999.
- Djabou N, Lorenzi V, Guinoiseau E, et al. Phytochemical composition of *Corsican teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control* 2013; 30(1): 354-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.025>
- Belabbes R, Dib MEA, Djabou N, et al. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem Biodivers* 2017; 14(5):e1600482 <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600482> PMID: 28109063
- Tian J, Ban X, Zeng H, Huang B, He J, Wang Y. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control* 2011; 22(12): 1992-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.018>
- Pandey DK, Tripathi NN, Tripathi RD. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptissu aveolens*. *J Plant Dis Prot* 1982; 89: 344-9.
- Bouayad Alam S, Dib MEA, Djabou N, et al. Essential oils as biocides for the control of fungal infections and devastating pest (*Tuta absoluta*) of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Chem Biodivers* 2017; 14(7):e1700065 <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201700065> PMID: 28422413
- Abbott WS. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 1925; 18: 265-7. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Radulović N, Denić M. Essential oils from the roots of *Echinops bannaticus* Rochel ex Schrad, and *Echinops sphaerocephalus* L. (Asteraceae): Chemotaxonomic and Biosynthetic Aspects. *Chem biodiverse* 2013; 10(4): 658-76.

- [28] Menut C, Lamaty G, Weyerstahl P, Marschall H, Seelmann I, Zollo PH. Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part I. Tricyclic sesquiterpenes from the root essential oil of *Echinops giganteus* var. *lelyi* C. D. Adams. *Flavour Fragrance J* 1997; 6(12): 415-21. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199711/12\)12:6<415::AID-FFJ666>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199711/12)12:6<415::AID-FFJ666>3.0.CO;2-T)
- [29] Tariku Y, Hymete A, Hailu A, Rohloff J. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. *Chem Biodivers* 2011; 8(4): 614-23. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201000331> PMID: 21480507
- [30] Djordjevic S, Petrovic S, Ristic M, Djokovic D. Composition of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Chem Nat Compd* 2015; 4(44): 410-2.
- [31] Tepe B, Sokmen M, Akpulat H, Sokmen A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem* 2006; (95): 200-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.031>
- [32] Zhao MP, Liu QZ, Liu Q, Liu ZL. Identification of larvicidal constituents of the essential oil of *Echinops grijsii* roots against the three species of mosquitoes. *Molecules* 2017; 22(2): 1-11. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22020205> PMID: 28134799
- [33] Tang X, Chen S, Wang L. *Isolation and Insecticidal activity of farnesol from Stelleria chamaejasme*. *Asian J Chem* 2001; 3(23): 1233-5.
- [34] Jin W, Shi Q, Hong C, Cheng Y, Ma Z, Qu H. Cytotoxic properties of thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. *Phytomedicine* 2008; 15(9): 768-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2007.10.007> PMID: 18068965
- [35] Nakano H, Cantrell CL, Mamonov LK, Osbrink WL, Ross SA. Echinopsacetylenes A and B, new thiophenes from *Echinops transiliensis*. *Org Lett* 2011; 13(23): 6228-31. <http://dx.doi.org/10.1021/ol202680a> PMID: 22066834
- [36] Hudson JB, Graham EA, Micki N, Hudson L, Towers GH. Antiviral activity of the photoactive thiophene alpha-terthienyl. *Photochem Photobiol* 1986; 44(4): 477-82. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1986.tb04695.x> PMID: 3024189
- [37] Herrmann F, Hamoud R, Sporer F, Tahrani A, Wink M. *Carlina oxide*--a natural polyacetylene from *Carlina acaulis* (Asteraceae) with potent antitrypanosomal and antimicrobial properties. *Planta Med* 2011; 77(17): 1905-11. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1279984> PMID: 21678234

Bentham Science Publishing
Personal Use Only
Not For Distribution

RESEARCH ARTICLE

Chemical Variability of *Atractylis gummifera* Essential Oils at Three Developmental Stages and Investigation of Their Antioxidant, Antifungal and Insecticidal Activities

Kenza Mejdoub^a, Imane Rihab Mami^b, Rania Belabbes^c, Mohammed El Amine Dib^{c,*}, Nassim DJabou^b, Boufeldja Tabti^c, Nassira Gaouar Benyelles^a, Jean Costa^d and Alain Muselli^d

^aLaboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels, Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie ; ^bLaboratory of Organic Chemistry, Natural Substances and Analyses (COSNA), University of Tlemcen, Algeria; ^cLaboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; ^dLaboratoire Chimie des Produits Naturels, UMR CNRS 6134 SPE, Campus Grimaldi, BP 52, 20250 Corté, France

Abstract: Background: *Atractylis gummifera* is a cosmopolitan species that is particularly abundant in the Mediterranean regions. It has been used to treat many diseases, including intestinal parasites, ulcers, snakebite poisoning, hydrops and drowsiness. As part of our research program on natural compounds with biological activities, the objective of this study was to determine for the first time the chemical composition and biological activities of essential oils of *Atractylis gummifera* during beginning of the vegetative cycle (March), beginning of the flowering stage (April) and full bloom (May/June).

Methods: The essential oils were obtained by means of hydrodistillation and its components were analyzed using gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). The antioxidant properties were evaluated using two different methods i) Radical scavenging activity (DPPH) and ii) β -carotene bleaching assay. Whereas, the antifungal activity of the essential oils was investigated against five plant fungi. The fumigation toxicity of essential oils was evaluated against adults of *Bactrocera oleae* better known as the olive fly.

Results: The essential oil produced from the plant taken at the beginning of the vegetative cycle (March) had a high level of non-terpenic aliphatic compounds. On the other hand, the essential oil obtained during the period from the beginning of the flowering stage (April) showed that its proportion of non-terpene compounds decreased and that of sesquiterpene compounds increased. Finally, the essential oils obtained during the period from full bloom (May/June) consisted mainly of acetylene compounds such as carlina oxide and 13-methoxy carlina oxide. The results showed that essential oils from plants at full bloom presented interesting antioxidant and antifungal properties, while essential oil produced from plants at the beginning of the vegetative cycle (March) and at the beginning of the flowering stage (April) had better insecticidal activity.

Conclusion: The data presented here constitutes new findings in the field of the chemical characterization and biological potential of *A. gummifera*.

Keywords: *Atractylis gummifera*, essential oil, biological activities, vegetative stages, gas chromatography, mass spectrometry.

1. INTRODUCTION

The research of new natural bioactive agents such as essential oils as source of antioxidant, antifungal and insecticide is primary because synthetic antioxidants and pesticides to protect food products against deterioration caused by oxidation, fungi and insect pests during production and storage during production and storage can affect human health and pollute the environment [1-3].

Essential oils, have received special attention as alternative compounds to the currently used antioxidant, antifungal and insecticides [4-6]. Biological properties of essential oils were attributed of some of their components, particularly phenols [7]. However, there are still many plants that have not yet been examined experimentally for their chemical compositions and biological properties. *A. gummifera* L. is a plant widely distributed in Northern Africa (Algeria, Morocco and Tunisia) and in Southern Europe (Italy, Greece, Spain and Portugal), it is an Asteraceae known as thistle. In Algeria, the genus *Atractylis* is represented by 16 species, 6 of which are endemic. *A. gummifera* is also known as *Carlina gummifera* Less [8]. In Algeria, the local population call

*Address correspondence to this author at the Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), Université de Tlemcen, BP 119, 13000, Algérie; Tel/Fax: 0021343411189; E-mail a_dibdz@yahoo.fr

it Addad (or Leddad), choûk el-eulk' (masticatory thistle). The therapeutic as well as the toxic properties of *A. gummifera* have long been recognized. In folk medicine, this plant is known for its diuretic, antipyretic, purgative and emetic properties [9]. It has been used to treat several conditions including intestinal parasites, ulcers, snake-bite poisoning, hydropsy and drowsiness [9]. To our knowledge, there is no information on the chemical composition of volatile compounds as well as the biological activities of this plant. Therefore, the aims of this work were to study i) the chemical composition of essential oil of *A. gummifera* at three developmental stages and ii) the investigation of their antioxidant, antifungal and insecticidal properties.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Plant Material and Essential oils Isolation

Roots of *A. gummifera* were collected from Oucheba station near Tlemcen city (Algeria) during the month of March (beginning of the vegetative cycle), in April (beginning of the flowering stage) and during May-June (stage of full bloom). Voucher specimens (AGDA1-3.06.2016) was deposited with the Herbarium of the University of Tlemcen. Essential oils were obtained from fresh roots by hydrodistillation for 5 h using a Clevenger-type apparatus. The essential oils were dried over anhydrous sodium sulfate and stored in dark glass bottle at 4°C until chemical analysis.

2.2. Gas Chromatography

Analyses were carried out using a Perkin Elmer Clarus 600 GC apparatus equipped with a dual flame ionization detection system and 2 fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm I.D., film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethyleneglycol). The oven temperature was programmed from 60°C to 230°C at 2°C/min and then held isothermally at 230°C for 35 min. Injector and detector temperatures were maintained at 280°C. Essential oils were injected in the split mode (1/50), using hydrogen as the carrier gas (0.7 mL min⁻¹); the injection volume was 0.2 µL. Retention indices (RI) of the compounds were determined from Perkin-Elmer software, as previously reported [10].

2.3. Gas Chromatography-mass Spectrometry

The essential oils were investigated using a Perkin Elmer TurboMass quadrupole analyzer, directly coupled with a Perkin Elmer Autosystem XL equipped with two fused-silica capillary columns (60 m x 0.22 mm, film thickness 0.25 µm), Rtx-1 (polydimethylsiloxane) and Rtx-Wax (polyethylene glycol). Other GC conditions were the same as described above. Ion source temperature was 150°C and energy ionization 70 eV; electron ionization mass spectra were acquired with a mass range of 35-350 Da and scan mass of 1 s. Oil injected volume was 0.1 µL and fraction injected volume of 0.2 µL, as previously reported [10].

2.4. Component Identification and Quantification

Identification of the components was made (i) through the comparison of their GC retention indices (RI) on non-polar and polar columns, determined relative to the retention time of a series of n-alkanes with linear interpolation, with

those of authentic compounds or literature data [11-14] and (ii) also through computer matching with commercial mass spectral libraries [15,16] and comparison of spectra with those of in-house laboratory library. Component quantification was carried out using peak normalization % abundances calculated by integrating FID response factors relative to tridecane (0.7 g/100 g), used as an internal standard [17].

2.5. Antioxidant Activity

2.5.1. DPPH Free Radical-Scavenging Activity

The free radical-scavenging activities of samples were measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), as described in the literature [18]. Fifty microliters of various concentrations of essential oil and hydrosol extract were added to 2 mL of DPPH solution of concentration of 60 µM. The absorbance was measured at 517 nm after a 30 min incubation period, as previously reported [10]. The IC₅₀ values, which represent the concentrations of the essential oils causing 50% neutralization, were determined by linear regression analysis. Tests were carried out in triplicate.

2.5.2. β-carotene Bleaching Assay

The antioxidant activity of the essential oils was carried by the β-carotene/linoleic model system using the method as described previously by Hatami *et al.* [19]. The essential oil and hydrosol extract concentration providing 50% inhibition (IC₅₀) was obtained plotting inhibition percentage versus sample solutions concentrations, as previously reported [17]. Tests were carried out in triplicate.

2.6. Antifungal Activities

2.6.1. Pathogenic Fungal Strains

The fungal isolates, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma spp.*, *Aspergillus flavus* and *Rhizopus oryzae*, causing olive rot, have been isolated directly from fruit in orchards and maintained in potato dextrose agar (PDA, Sigma-Aldrich, USA) in a growth chamber at 23 °C for 14 days in the darkness. Each isolate was purified by a single spore isolation technique and identified based on cultural and morphological characteristics [20,21]. The conidia were obtained from the surface of the agar and suspended in 5 mL of sterile distilled water containing 0.1% v/v Tween 80. Spore suspensions were filtered through four layers of sterile cheesecloth to remove mycelial fragments. The number of spores was calculated with an automated cell counter (Bio-Rad's TC20), Cellometer Vision, and the spore concentration was adjusted to 1 x 10⁶ spores/mL with the aid of a haemocytometer prior to use, as previously reported [17].

2.6.2. In vitro Antifungal Assay

Antifungal activity of the extracts was tested against *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma spp.*, *Aspergillus flavus* and *Rhizopus oryzae* strains. The method used was a modification of Tian *et al.*, (2015) [22] which was based on a method published by Singh *et al.* (2008) [23]. Aliquots of extracts dissolved separately in 0.5 mL of 10% (v/v) DMSO were pipetted aseptically to 9-cm glass Petri dishes containing 9.5 mL of molten PDA to procure the requisite concentrations. Control plates (without extracts) were inoculated following the same procedure. A 9-mm fun-

gal disc of mycelial material, cut from the periphery of a 5-day-old culture with a sterile cork-borer, was inoculated aseptically to the center of the prepared treatment and control Petri dishes. The plates were sealed with polyethylene film and incubated at a temp. of 27 °C. The efficacy of the treatment was evaluated each day for 7 days by measuring the average of 2 perpendicular diameters of the colony. All tests were performed in triplicate, as previously reported [17]. Percentage inhibition of the radial growth of the tested fungi by the oils compared with the control was calculated at day 7, using the following formula.

$$I\% = (DC - DT/DC) \times 100,$$

where DC and DT are average diameters of fungal colony of control and treatment, respectively.

2.7. Rearing of Test Insects

Bactrocera oleae flies were caught with chamP traps containing a solution of 3% ammonium phosphate. Identification of flies was realized by Prof. Nassira Gaouar Benyelles (Laboratory of Ecology and Management of Natural Ecosystems of University of Tlemcen Algeria).

The flies culture was maintained in the temperature and humidity-controlled chamber in darkness at a temperature of 26-27 °C and 80% relative humidity, as suggested by Kumar *et al.* (2014) [24].

2.8. Fumigation Toxicity of *A. gummifera* Essential oil Against *B. oleae*

To determine the fumigant toxicity of *A. gummifera* essential oils, appropriate concentrations, viz., 50, 125, 275 and 325 µL of essential oils were applied separately on the filter papers (Whatman No. 1, 2 cm diameter) without using any solvent, and the filter papers were attached to the under-surface of lids of plastic jars with 1 L volumes. The control sets received no essential oil. The lids were screwed tightly on the jars containing 10 insect each, all of the same age. These were kept at a temperature of 25-26 °C and 80-85% relative humidity. Mortality was checked after 24 h from commencement of exposure. The percentage of insect mortality was calculated using the Abbott correction formula [25].

$$\text{Corrected mortality} = (\text{OMT} - \text{OMC}) / (100 - \text{CM}) \times 100$$

MOT : Observed mortality in treatment; MOC : Observed mortality in control; MC : Control mortality

$$\text{Percentage mortality} = (\text{Number of dead larvae} / \text{Number of larvae introduced}) \times 100$$

2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis of variance (ANOVA) was performed using the SAS software and means were separated using the Least Significant Difference (LSD) test at $P \leq 0.05$. Analysis of each test was performed in triplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical Composition of Essential Oils

The results showed that essential oil yield varied significantly according to its harvest period, they ranged from 0.07

to 0.22% (Table 1). The lowest amount of essential oil was produced by the plant at the beginning of the vegetative cycle (0.07%), then the yields kept on increasing to reach 0.12% at the beginning of the flowering stage and 0.22% at the stage of full bloom. Essential oils were analyzed by GC and GC-MS and their chemical compositions are presented in Table 1. In total, 40 compounds which accounted for 94.6-97.8% of the total oils were identified. All components were identified by comparison of their EI-MS and GC (RIs) with those of our laboratory-produced 'Aromes' library (Table 1). Among them, 15 sesquiterpenes, 6 monoterpenes, 14 aliphatic, 3 diterpenes and 2 furano acetylene compounds were identified. The essential oil produced from the plant taken at the beginning of the vegetative cycle (March) has a high level of non-terpenic aliphatic compounds (53.6%), such as hexadecanol (19.5%), tetracosane (10.5%), tricosane (8.2%), pentacosane (5.2%) and hexacosane (4.5%). Carlina oxide and α -palmitolactone represented 10.3% and 8.3% of the total essential oil, respectively (Table 1). The essential oil obtained during the period from the beginning of the flowering stage (April) showed its proportion of non-terpene compounds decrease suddenly (53.6 to 12.4%) and that of sesquiterpene compounds increase (13.6 to 25.2%).

The main components were (E)- β -caryophyllene (19.6%), carlina oxide (23.8%), α -palmitolactone (14.4%) and hexadecanol (7.6%). Finally, the essential oils obtained during full bloom, (May to June) were consist mainly of acetylenic compounds (68.3%) such as carlina oxide (63.2%) and 13-methoxy carlina oxide (5.1%) (Fig. 1 and Table 1).

A comparison of chemical compositions of *A. gummifera* essential oils obtained from the three vegetative stages showed that chemical composition of essential oil varied significantly with the physiological stage of the plant. We note from this study, that in general the samples of *A. gummifera* essential oils harvested in full bloom were rich in acetylenic compounds such as carlina oxide and the samples collected at the beginning of the flowering stage were richer in (E)- β -caryophyllene and α -palmitolactone. Carlina oxide was isolated for the first time in 1889 [26] and has been reported in the Asteraceae family and in particular has been isolated in the essential oils of *Carlina acanthifolia*, *Carlinae radix* and *Carlina acaulis* [27,28]. On the other hand, studies on the chemical composition of *A. gummifera* are rare. Only a few saponins, flavonoids, triterpenoids and phenolic compounds were identified [29].

3.2. Antioxidant Activities of Essential Oil

The antioxidant properties of essential oils of three vegetative stages were evaluated using two different methods i) Radical scavenging activity and ii) the β -carotene bleaching method, using BHT as positive control. Table 2 represents the percentage inhibitions of different essential oils according to concentrations tested. The essential oil obtained during full bloom stage had a very strong antioxidant power by the DPPH and β -carotene bleaching methods. Indeed, the values of their IC_{50} (2.6 mL/L for DPPH and 8.3 mL/L for β -carotene bleaching) were lower than that of the control BHT (16.4 and 4.3 mL/L, respectively). However, essential oils obtained during March and April had the lowest antioxidant activities, with IC_{50} s varied of 25,2 to 56,6 mL/L (Table 2).

Table 1. Chemical compositions of *A. gummifera* essential oils during to its vegetative cycle.

N ^o ^a	Compounds	Li/RI ^a ^b	RI ^a ^c	RI _p ^d	Essential oils			Identification ^f
					March	April	May/June	
1	Benzaldehyde	929	930	1527	-	tr	-	IR, SM
2	Myrcene	979	981	1557	0.1	4.1	0.1	IR. SM
3	Decane	1000	1000	1000	0.8	tr	-	IR. SM
4	p-Cymene	1011	1013	1270	0.1	0.7	-	IR. SM
5	γ -Terpinene	1047	1050	1238	1.2	0.8	-	IR. SM
6	Acetophenone	1034	1031	1605	1.5	2.1	0.1	IR. SM
7	Carvone	1222	1218	1738	1.8	0.1	-	IR. SM
8	Thymol	1266	1273	2189	0.3	0.1	-	IR. SM
9	Carvacrol	1278	1280	2219	-	-	0.1	IR. SM
10	Dodecenal	1389	1395	1708	0.1	1.4	-	IR. SM
11	(E)- β -Caryophyllene	1424	1425	1591	10.6	19.6	8.5	IR. SM
12	(E)- β -Farnesene	1448	1448	1661	-	-	0.1	IR. SM
13	α -Humulene	1456	1452	1665	0.2	0.9	0.4	IR. SM
14	γ -Muurolene	1471	1471	1681	0.3	1.3	tr	IR. SM
15	Germacrene D	1480	1485	1704	0.1	0.7	0.5	IR. SM
16	(E)- β -Bergamotene	1480	1484	-	-	0.8	0.4	IR. SM
17	(E,E)- α -Farnesene	1498	1498	1744	0.6	0.8	0.2	IR. SM
18	τ -Cadinene	1507	1507	1752	0.1	-	-	IR. SM
19	α -Cadinene	1515	1516	1752	0.5	1.3	0.2	IR. SM
20	Carlina oxide	-	1580	2380	10.3	23.8	63.2	IR. SM
21	Humulene epoxide	1601	1601	2044	0.3	2.2	0.2	IR. SM
22	α -Eudesmol	1639	1632	2208	0.5	0.9	tr	IR. SM
23	β -Eudesmol	1641	1649	2229	0.3	0.3	0.1	IR. SM
24	α -Cadinol	1645	1652	2231	0.2	0.3	0.3	IR. SM
25	α -Bisabolol	1672	1681	2217	0.1	0.4	5.5	IR. SM
26	(E,E)-Farnesol	1707	1711	2259	0.1	0.5	4.6	IR. SM
27	13-Methoxy carlina oxide	1789	1800	2104	1.0	0.7	5.1	IR. SM
28	Phytone	1844	1846	2131	3.1	2.9	1.1	IR. SM
29	Neophytadiene	1840	1851	1922	0.9	1.2	tr	IR. SM
30	Hexadecanol	1864	1869	1944	19.5	7.6	2.1	IR. SM
32	Nonadecane	1900	1904	1900	0.6	0.1	-	IR. SM
32	Eicosane	2000	2018	2000	0.6	tr	0.1	IR. SM
33	α -Palmitolactone	2104	2098	2815	8.3	14.4	0.6	IR. SM
34	Heneicosane	2100	2121	2100	1.4	0.1	3.1	IR. SM
35	(E)-Phytol	2099	2124	2604	0.6	1.3	1.2	IR. SM

Table (1) contd....

N ^o ^a	Compounds	Lit/RI ^a ^b	RI ^a ^c	RI ^p ^d	Essential oils			Identification ^f
					March	April	May/June	
36	Docosane	2200	2223	2200	1.2	tr	-	IR. SM
37	Tricosane	2300	2325	2300	8.2	tr	-	IR. SM
38	Tetracosane	2400	2426	2400	10.5	tr	-	IR. SM
39	Pentacosane	2500	2527	2500	5.2	3.2	-	IR. SM
40	Hexacosane	2600	2625	2600	4.5	tr	-	IR. SM
% Identification					96.7	94.6	97.8	
Yields %					0.07	0.12	0.22	
% Hydrocarbon monoterpenes					2.9	7.7	0.2	
% Oxygenated monoterpenes					3.3	3.7	0.5	
% Hydrocarbon sesquiterpenes					12.1	20.9	9.9	
% Oxygenated sesquiterpenes					1.5	4.3	10.7	
% Acetylene					11.3	24.5	68.3	
% Hydrocarbon diterpenes					0.9	1.2	-	
% Oxygenated diterpenes					3.7	4.2	2.3	
% Lactones					8.3	14.4	0.6	
% Non terpenic compounds					53.6	12.4	5.3	

^a Order of elution is given on apolar column (Rtx-1). ^b Retention indices of literature on the apolar column (IRIa) reported from the literature [24]. ^c Retention indices on the apolar Rtx-1 column (RIa). ^d Retention indices on the polar Rtx-Wax column (RIp). ^e RI. retention indices; MS. mass spectrometry in electronic impact mode; Ref. compound identified from literature data [11].

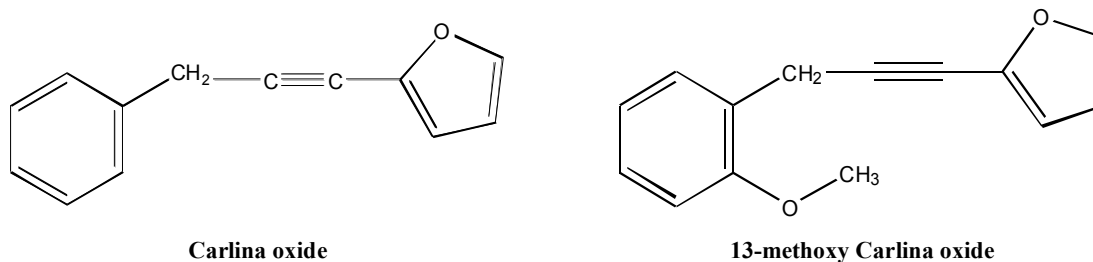


Fig. (1). The main components of *A. gummifera* obtained during full bloom.

Table 2. Antioxidant activities of *A. gummifera* essential oils during its developmental stage.

Antioxidant Tests	IC ₅₀ mL/L			
	Essential oil March	Essential oil April	Essential oil May/June	BHT
DPPH	56.6 ± 4.8	34.2 ± 5.6	12.6 ± 1.4	16.4 ± 1.1
β-Carotene bleaching	35.1 ± 4.6	25.2 ± 3.8	3.3 ± 0.8	4.3 ± 0.6

Each value is represented as mean ± SD.

Essential oil produced during full bloom presented a high antioxidant activity. These properties are related probably to its chemical profile, in particular to the high percentage of acetylenic compounds and it could be presumed that these compounds are mainly responsible for exhibited antioxidant effects by oils of *A. gummifera*. Indeed, the essential oil of

Carlina acanthifolia rich of carlina oxide presented high DPPH scavenging activity [28]. On the other hand, antioxidant activity of *A. gummifera* can be also explained by the presence of other minor bioactive compounds acting synergistically or interaction of all constituents present in the essential oil.

3.3. In vitro Tests of the Three Vegetative Stage Essential Oils Against Plant Fungi

The effects of essential oils were evaluated against fungal phytopathogens: *P. expansum*, *A. niger*, *Trichoderma spp.*, *A. flavus* and *R. oryzae* (Table 3). The approach of effective concentrations causing a 50% inhibition of mycelial growth (EC_{50}) shows that all essential oils presented an interesting antifungal activity against all fungi tested. The highest activity was observed by essential oil produced during the full bloom (period from May to June) against *Trichoderma spp.*, *P. expansum*, *A. flavus* and *A. niger* with EC_{50} s < 5 mg/L, whereas, *A. oryzae* seemed to be the least sensitive strain with EC_{50} > 10 mg/L. The results also indicated that the inhibition of the mycelial growth of all strains was significantly influenced by essential oil produced during the period of March/April, the EC_{50} s were upper to > 10 mg/L for all strains, except for *R. oryzae*, or we observed no inhibition (Table 3).

Essential oil produced at full bloom, showed effective antifungal activity against many strains, such as *P. expansum*, *spp.*, *A. flavus* and *A. niger*. The magnitude of the antifungal activity may be related to the effect caused by the interaction of some bioactive components in a greater proportion to those present in minor amounts.

Herrmann et al., (2011) studied antifungal activity of carlina oxide isolated to *Carlina acaulis* against *streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and *Candida glabrata*. It has been proved that Carlina oxide exhibited strong antimicrobial activity against all the strains of

bacteria and fungi, even against the multiresistant strains and the clinical isolates [30]. On the other hand, very little study of this molecule is available in the literature. Furthermore, the farnesol has been confirmed to have inhibitory effect on the growth of microorganisms and can act as an antifungal agent [31, 32]. It has been shown that, β -caryophyllene demonstrated selective antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and more pronounced anti-fungal activity than kanamycin [33]. Moreover, the extent of the antifungal activity can be related to a synergistic effect with some active components, and therefore, they are promising natural food preservatives for the bio-control of fungi [34].

3.4. Fumigation Toxicity

The results on fumigation toxicity of *A. gummifera* essential oils against *B. oleae* insect are summarized in Table 4. The efficacy of essential oils varied with their concentrations, at 325 mL/L air, essential oils produced during March/April, caused mortality of 86.6%, while, essential oil produced during period from May to June (full bloom) caused a mortality of 66.7% after 24 h of exposure (Table 4).

The results showed that essential oil also presented interesting fumigation toxicity, when looking to its values. These properties are related probably to its chemical composition, particularly to the relative high percentage of carlina oxide, (E-E)-farnesol, α -bisabolol and β -caryophyllene. The insecticidal activity of farnesol has been reported [35]. The results of laboratory bioassay showed that farnesol had good insecticidal activity against *Aphis craccivora* and *Leucania separata* [35]. α -Bisabolol, has been shown to have fungicidal

Table 3. In-vitro antifungal activity against phytopathogenic fungi.

Microorganisms	Essential oil (mg/L)					
	Essential oil March/April		EC_{50} mg/L	Essential oil May/June		
	5	10		5	10	EC_{50} mg/L
<i>P. expansum</i>	36.6±4.8	46.1±5.6	> 10	68.8±7.8	100±00	< 5
<i>A. niger</i>	21.1±3.2	31.1±4.8	> 10	65.5±6.5	71.1±9.5	< 5
<i>Trichoderma spp.</i>	80.2±6.8	90.2±9.6	< 10	98.1±8.8	100±00	< 5
<i>A. flavus</i>	11.1±0.9	21.1±1.9	> 10	55.5±6.5	59.3±5.3	< 5
<i>R. oryzae</i>	00±00	00±00	-	35.5±3.5	38.8±6.5	> 10

Each value is represented as mean ± SD.

Table 4. Larvicidal efficacy of *A. gummifera* essential oils against *B. oleae* insect.

Concentrations (μ L/L air)	% Mortality ± SE	
	Essential oil March/April	Essential oil May/June
50	00 ± 00 ^a	00 ± 00 ^a
125	13.3 ± 0.6 ^a	00 ± 00 ^a
275	46.6 ± 1.6 ^b	33.3 ± 1.6 ^c
325	86.6 ± 3.2 ^c	66.7 ± 4.1 ^d

Each value is represented as mean ± SD.

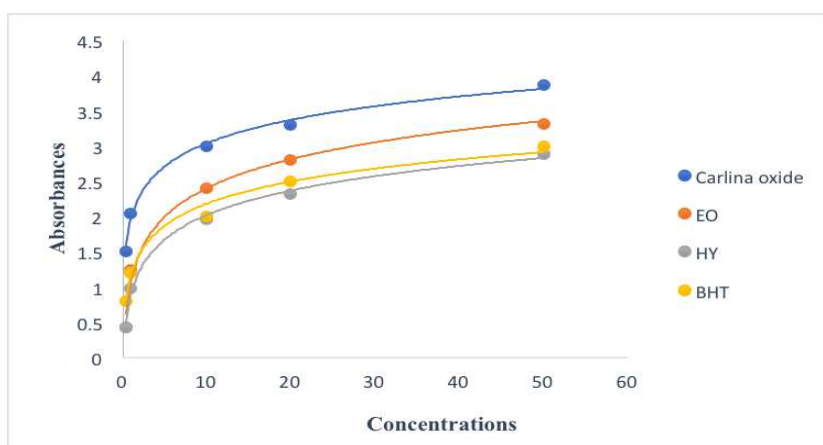


Fig. (2). Reducing power activities of *C. caeruleus* essential oil (EO), hydrosol extract (HY) and carlina oxide

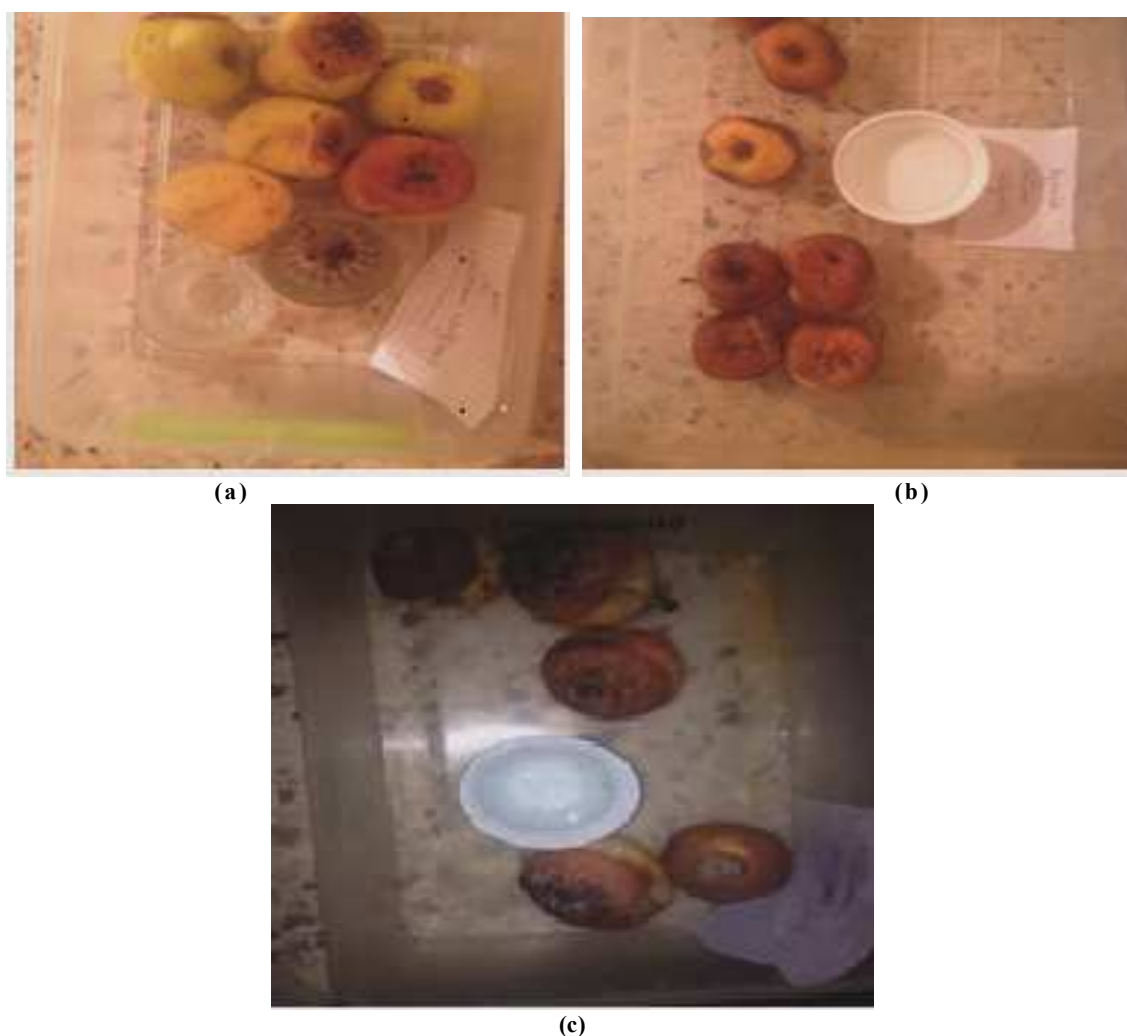


Fig. (3). Apples treated with carlina oxide (a), Apples treated with essential oil (b) and control positive (Without treatment) (c) on the infection caused by *P. expansum* after 15 days of storage at 25 ± 1 °C.

properties against the nongerminated and germinating conidia of several species of *Aspergillus* and *Fusarium* which represent problems in agriculture and medicine [23]. While, β -caryophyllene is known for its cytotoxicity, anti-inflammatory and antifungal activities [36, 37]. Carlina oxide has been shown displaying strong and selective activity

against *Trypanosoma brucei*, the parasite responsible for African trypanosomiasis (sleeping sickness).

CONCLUSION

In conclusion, we aimed as part of our program to evaluate antioxidant, antifungal and insecticidal activities of *A.*

gummifera essential oil during its vegetative cycle, in hopes to find new natural products. The results showed that essential oil of *A. gummifera* is a good source of polyacetylene compounds as carlina oxide and 13-methoxy carlina oxide. The essential oils from full bloom of *A. gummifera* presented high antioxidant and antifungal properties, while essential oil produced from plants at the beginning of the vegetative cycle (Mars) and the beginning of the flowering stage (April) had better insecticidal activity. The data presented here constitutes new findings in the field of the chemical characterization and biological potential of *A. gummifera*.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are the base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the Ministère des Affaires Étrangères et Européennes throughout the ‘Partenariat Hubert Curien Tassili’ research program.

REFERENCES

- Shakeri, A.; Sharifi, M.J.; Bazzaz, B.S.F.; Emami, A.; Soheili, V.; Sahebkar, A.; Asili, J. Bioautography Detection of Antimicrobial Compounds from the Essential Oil of *Salvia Pachystachys*. *Curr. Bioact. Compd.*, **2018**, *14*, 80-85.
- Kumar, P.; Mishra, S.; Malik, A.; Satya, S. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly *Musca domestica*. *Med. Vet. Entomol.*, **2011**, *25*, 302-310.
- Lanigan, R.S.; Yamarik, T.A. Final report on the safety assessment of BHT. *Int. J. Toxicol.*, **2002**, *21*, 19-94.
- Batish, D.R.; Singh, H.P.; Kohli, R.K.; Kaur, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecol. Manag.*, **2008**, *256*, 2166-2174.
- Andrade, M.A.; Braga, M.A.; Cesar, P.H.S.; Trento, M.V.C.; Espósito, M.A.; Silva, L.F.; Marcussi, S. Anticancer Properties of Essential Oils: An Overview. *Curr. Bioact. Compd.*, **2018**, *18*(10), 957-966.
- Zardo, D.M.; Alvarez, L.V.H.; Los, F.B.G.; Ito, V.C.; Travalini, A.P.; Cardoso, T.; Wojeicchoski, J.P.; Alberti, A.; Zielinski, A.A.F.; Esmerino, L.A.; Nogueira, A. *In vitro* Assessment of the Antibacterial and Antioxidant Properties of Essential Oils. *Curr. Bioact. Compd.*, **2018**, *14*, 1-8.
- Amorati, R.; Menichetti, S.; Mileo, E.; Pedulli, G.F.; Vigliani, C. Hydrogen-atom transfer reactions from ortho-alkoxy-substituted phenols: an experimental approach. *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 4402-4410.
- Quezel, P.; Santa, S. *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Ed.; CNRS, **1963**; Vol. II, pp. 999-1002.
- Catanzano, G.; Delons, S.; Benyahia, T.D. 2 cases of poisoning due to “gum thistle” (*Atractylis gummifera* L.). Clinical development and anatomo-pathologic lesions. *Maroc. Medical.*, **1969**, *49*, 651-655.
- Belabbes, R.; Dib, M.E.A.; Djabou, N.; Ilias, F.; Tabti, B.; Costa, J.; Muselli, A. Chemical Variability, Antioxidant and Antifungal Activities of Essential Oils and Hydrosol Extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chem. Biodiversity*. **2017**, *14*: e1600482.
- Jennings, W.; Shibamoto, T. *Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography*, In: Jovanovich, H.B (Ed.), First ed., Academic Press: New-York, **1980**.
- König, W.A.; Hochmuth, D.H.; Joulain, D. *Terpenoids and Related Constituents of Essential oils*, first ed., Library of Mass Finder 2.1: Institute of Organic Chemistry: Hamburg, **2001**.
- National Institute of Standards and Technology. NIST Chemistry WebBook, Reference Database, Gaithersburg, MD. **2008**. www.webbook.nist.gov/chemistry.
- Mc Lafferty, F.W.; Stauffer, D.B. *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data*, first ed., Wiley-Interscience: New-York, **1988**.
- Mc Lafferty, F.W.; Stauffer, D.B. *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 6th ed., Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, version 3.10d. Palisade: Newfield. **1994**.
- National Institute of Standards and Technology: PC Version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT, USA. **1999**.
- Djabou, N.; Lorenzi, V.; Guinoiseau, E.; Andreani, S.; Giuliani, M.C.; Desjobert, J.M.; Bolla, J.M.; Costa, J.; Berti, L.; Luciani, A.; Muselli, A. Phytochemical composition of *Corsican Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxin-infectious pathogens. *Food Control*. **2013**, *30*(1), 354-363.
- Sahin, F.; Güllüce, M.; Daferera, D.; Sökmen, A.; Sökmen, M.; Polissiou, M.; Agar, G.; Özer, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. **2004**, *15*, 549-557.
- Hatami, T.; Emami, S.A.; Miraghaee, S.S.; Mojarrah, M. Total phenolic contents and antioxidant activities of different extracts and fractions from the aerial parts of *Artemisia biennis* Willd. Iran. *J. Pharm. Res.*, **2014**, *13*, 551-558.
- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, **2006**.
- De Hoog, G.S.; Guarro, J. *Atlas of Clinical Fungi*. Ed., CBS, Barcelona. **1995**.
- Tian, J.; Ban, X.; Zeng, H.; He, J.; Huang, B.; Wang, Y. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cicuta virosa* L. var. *Latisecta Celak*. *Int. J. Food Microbiol.*, **2011**, *145*, 464-470.
- Singh, P.; Srivastava, B.; Kumar, A.; Kumar, R.; Dubey, N.K.; Gupta, R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *J. Sci. Food Agric.*, **2008**, *88*, 2421-2425.
- Kumar, P.; Mishra, S.; Malik, A.; Satya, S. Bio-Control Potential of Essential Oil Monoterpenes Against Housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2014**, *100*, 1-6.
- Abbott, W.S. A Method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **1925**, *18*, 265-267.
- Z. Stojanovic-Radic, L. Comic, N. Radulovic, P. Blagojevic, T. Mihajilov-Krstev and J. Rajkovic. Commercial *Carlina* radix herbal drug: botanical identity, chemical composition and antimicrobial properties. *Pharmaceutical Biology*. **2012**, *50*, 933-940.
- Djordjevic, S.; Petrovic, S.; Ristic, M.; Djokovic, D. Composition of *Carlina acanthifolia* Root Essential Oil. *Chem. Nat. Comp.*, **2005**, *44*(4), 410-412.
- Djordjevic, S.; Petrovic, S.; Ristic, S.; Djokovic, D.; Milenkovic, M.; Vucicevic, M.; Zizic, D.; Kukic, J. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *109*, 458-463.
- Calmes, M.; Crespin, F.; Maillard, C.; Ollivier, E.; Balansard, G. Highperformance liquid chromatographic determination of atracyloside and carboxyatracyloside from *Atractylis gummifera* L. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **1994**, *663*, 119-122.
- Herrmann, F.; Hamoud, R.; Sporer, F.; Tahrani, A.; Wink, M. *Carlina Oxide*- A Natural Polyacetylene from *Carlina acaulis* (Assteraceae) with Potent Antitrypanosomal and Antimicrobial Properties. *Planta Med.*, **2011**, *77*, 1905-1911.
- Cordeiro, R.A.; Nogueira, G.C.; Brillhante, R.S.N.; Teixeira, C.E.C.; Mourão, C.I.; Castelo-Branco, D.S.C.M.; Araujo Neto, P.M.; Ribeiro, J.F.; Monteiro, A.J.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. Farnesol inhibits *in vitro* growth of the *Cryptococcus neoformans* species

- complex with no significant changes in virulence-related exoenzymes. *Vet. Microbiol.*, **2012**, *159*, 375–380.
- [32] Cordeiro, R.A ; Teixeira, C.E ; Brilhante, R.S ; Castelo-Branco, D.S ; Paiva, M.A ; Giffoni Leite, J.J ; Lima, D.T ; Monteiro, A.J ; Sidrim, J.J ; Rocha, M.F, Minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, azoles and caspofungin against *Candida* species are reduced by farnesol. *Med. Mycol.*, **2013**, *51*, 53–59.
- [33] Dahham, S.S; Tabana, Y.M; Iqbal, M.A; Ahamed, M.B.K; Ezzat, M.O ; Majid, A.S.A ; Majid, A.M.S.A. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. **2015**, *20*, 11808-11829.
- [34] Kumar, A.; Shukla, R.; Singh, P.; Prasad, C.S.; Dubey, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil as a Safe Botanical Preservative Against Post-Harvest Fungal Infestation of Food Commodities. *Innov Food Sci. Emerg. Technol.*, **2008**, *9*, 575-580.
- [35] Tang, X.; Chen, S.; Wang, L. Isolation and Insecticidal activity of farnesol from *Stellera chamaejasme*. *Asian. J. Chem.*, **2011**, *23*(3), 1233-1235.
- [36] Gertsch, J.; Leonti, M.; Raduner, S.; Racz, I.; Chen, J.Z.; Xie, X.Q.; Altmann, K.H.; Karsak, M.; Zimmer, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci.*, **2008**, *105*(26), 9099-9104.
- [37] Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Di Cesare Mannelli, L.; Mazzanti, G.; Bartolini, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Pharmacol.*, **2011**, *56*, 387-389.

ملخص:

إنَّ الطَّلَب المتزايد على المُنتجات الطبيعية يُقلِّل من استخدام المواد الكيميائية الاصطناعية. و لهذا فإنَّ الهدف من بحثنا هو الإسهام في تقييم ثلاث نباتات من الفصيلة النجمية (Asteraceae): القرطم الأزرق (*Carthamus caeruleus*) و القنبيسة البينسية (*Anacyclus valentinus*) و الأقحوان النَّاجي (*Chrysanthemum coronarium*). أكسيد كارلينا و هو المُركَّب الرَّئيسي المُستخلص من الزيت الأساسي و هيدرولات جذور *C. caeruleus* ومشتقاته المُتَّحَصَّل عليها بالإصطناع الجزئي، أظهرت خصائص هامة مضادَّة للأكسدة. في حين أن الزيت الأساسي أثبت أفضل نتيجة كمضاد للحشرات. علاوة على ذلك فإن أكسيد كارلينا أظهر نتائج مضادة للفطريات واعدة في الجسم الحي للسيطرة على الفطر *P. expansum*. بالإضافة إلى ذلك فإن أفضل نشاط كمضاد للميكروبات بالمحاكات بالحاسوب أنسب للمُشتق IM9. من ناحية أخرى، أظهر مزيج الزيوت الأساسية لـ *Ammoides verticillata* و *C. caeruleus* تأثيرات تآزرية كبيرة، تفوق بكثير تلك الموجودة في مضادات الأكسدة الاصطناعية. من جانب آخر، تمتلك الزيوت الأساسية لكل من *A. valentinus* و *C. coronarium* مزيج من المركبات بنسب متفاوتة. بالإضافة إلى ذلك، لاحظنا أن الزيوت الأساسية لـ *A. valentinus* و *C. coronarium* فردياً أو مجتمعة لها تأثير حامي ووقائي على الجسم الحي ضد فطر *P. expansum* على التفاح والاصاص. أظهر مزيج هذين الزيتين تأثيراً تآزرياً للنشاط المضاد للأكسدة، لكنه لا يفوق نشاط BHT، بينما يعطي مزيج الأجزاء التي تحتوي على المركبات الأكسجينية تأثيراً معاكساً للنشاط المضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: الفصيلة النجمية، زيت اساسي، تركيب نصفى، نشاط بيولوجي، نمذجة جزيئية، تأثير تآزري وتأثير معاكس.

Résumé :

La demande croissante des produits naturels minimise l'utilisation des produits chimiques de synthèse. De ce fait, notre travail avait pour objectif principal de contribuer à la valorisation de 3 plantes de la famille des astéracées: *Carthamus caeruleus*, *Anacyclus valentinus* et *Chrysanthemum coronarium*. L'oxyde de carlina provenant de l'HE et d'hydrolat des racines de *C. caeruleus* et ses analogues obtenus par hémisynthèse présentait des propriétés antioxydantes, tandis que l'huile essentielle avait une meilleure activité insecticide. De plus, l'oxyde de carlina a démontré une activité antifongique *in vivo* prometteuse pour contrôler l'infection des pommes par *P. expansum*. En outre, la meilleure activité anti-microbienne *in-silico* a été attribuée à l'analogue IM9. D'autre part, le mélange des huiles essentielles de *A. verticillata* et *C. caeruleus* a montré des effets synergiques importants, bien supérieurs à ceux de l'antioxydant synthétique. D'autre part, le mélange des huiles essentielles de *A. verticillata* et *C. caeruleus* a montré des effets synergiques importants, bien supérieurs à ceux de l'antioxydant synthétique. Par ailleurs, les huiles essentielles de *A. valentinus* et de *C. coronarium* possèdent une matrice de composés à de différentes proportions. En outre, nous avons constaté que les huiles essentielles de *A. valentinus* et *C. coronarium* individuelle ou en combinaison possède un effet protecteur et préventif *in vivo* contre *P. expansum* sur les pommes et les. La combinaison de ces deux huiles a montré un effet synergique pour l'activité antioxydante mais qui reste inférieur à celui du BHT tandis ce que le mélange des fractions oxygénées donne un effet antagoniste.

Mots clés : Astéracées, huile essentielle, hémisynthèse, activité biologique, modélisation moléculaire, synergie et antagonisme.

Summary :

The increasing request for natural products reduces the use of chemical synthesis products. Therefore, the main objective of our work was to contribute to the valorization of 3 plants of the Asteraceae family: *Carthamus caeruleus*, *Anacyclus valentinus* and *Chrysanthemum coronarium*. carlina oxide, the main compound extracted from the essential oil and hydrosol of the roots of *C. caeruleus* and its analogues obtained by hemisynthesis showed interesting antioxidant properties, while the essential oil exhibit a better insecticidal activity. In addition, carlina oxide showed promising *in vivo* antifungal activity to control *P. expansum* infection in apples. As well, the best *in-silico* anti-microbial activity was attributed to the IM9 analogue. On the other hand, the combination of the essential oils of *Ammoides verticillata* and *C. caeruleus* has shown significant synergistic effects, far superior to those of the synthetic antioxidant. Moreover The essential oils of *A. valentinus* and *C. coronarium* possess a matrix of compound in different proportions. In addition, we have observed that essential oils of *A. valentinus* and *C. coronarium* individually or in combination have an *in vivo* protective and preventive effect against *P. expansum* on apples and pears. The combination of these two oils showed a synergistic effect for the antioxidant activity, but it is still lower than that of BHT, while the mixture of the oxygen fractions gives an antagonistic antioxidant effect.

Keywords : Asteraceae, essential oil, hemisynthesis, biological activity, molecular modeling, synergy and antagonism.

